

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Tereza Flohrová

Molekulární mechanismy toxicity mikroplastů
Molecular mechanisms of microplastics toxicity

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: **Prof. RNDr. Tomáš Cajthaml, Ph.D., DSc.**

Praha, 2020

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli Prof. RNDr. Tomáši Cajthamlovi, Ph.D., DSc. za velkou trpělivost a vstřícnost při konzultacích. Také bych ráda poděkovala RNDr. Janě Boháčkové za věcné rady při psaní bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat rodině, svému chlapci a širokému okolí přátel za podporu při psaní.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze,

Podpis

Molekulární mechanismy toxicity mikroplastů
Molecular mechanisms of microplastics toxicity

Mikroplasty, toxicita, eukaryotické buňky, ovlivnění genové exprese, vliv na metabolismus.
Microplastics, toxicity, eukaryotic cells, gene expression modulation, metabolism modulation.

Mikroplasty jsou všudypřítomné plastové úlomky o velikosti pod 5 mm. Kromě oceánů, řek, půdy a vzduchu se nacházejí i v jídle. Do přírody se plasty dostávají majoritně lidskou činností, kde se poté rozkládají na menší úlomky. Zdrojem mikroplastů mohou být například kosmetické produkty, obalové materiály a oblečení. Byla publikována řada studií ukazující negativní efekty na biotu, nicméně způsob toxicity je do značné míry nejasný.

Cílem této bakalářské práce je shrnout nejdůležitější odborné práce, které popisují účinky mikroplastů na buněčné úrovni. Pojednávané téma je nové a důležité. Současné poznatky ukazují, že mikroplasty a zejména nanoplasty ovlivňují expresi studovaných genů při studiích jak *in vitro*, tak *in vivo*. Dále navozují oxidativní stres a ovlivňují metabolické parametry buněk.

Microplastics are small ubiquitous fragments of plastic ranging from 100 nm to 5 mm. Apart from the oceans, rivers, land and air, microplastics are also present in food. Plastics enter into the nature due to human activities, where they decompose afterward to smaller fragments. Sources of microplastics are for instance cosmetic products, clothing and varieties of packaging materials. Several studies were published showing negative effects on biota, however the mode of toxicity is largely unclear.

Therefore, the aim of this bachelor thesis is to summarize the most relevant scientific papers describing the effects of microplastics at the cellular level. The discussed topic is new and important. Recent knowledge suggests that microplastics, and especially nanoplastics, affect the expression of studied genes both *in vitro* and *in vivo*. They also induce oxidative stress and affect the metabolic parameters of cells.

Obsah

Seznam zkratk.....	1
1. Úvod.....	1
2. Mikroplasty a nanoplasty	2
2.1 Mikroplasty	2
2.2 Nanoplasty.....	2
3. Průnik mikroplastů a nanoplastů do buňky	3
4. Příčiny působení MP a NP	5
4.1 Oxidativní stres.....	5
4.1.1 Vznik reaktivních forem kyslíku	5
4.1.2 Genová exprese	6
4.1.3 Enzymy antioxidačního systému	7
4.1.4 Proteiny teplotního šoku.....	7
4.1.5 Cytochrom P450.....	9
4.1.6 Apoptóza.....	9
4.2 Genotoxicita	13
4.3 Imunotoxicita.....	15
4.3.1 Identifikace částic buňkami imunitního systému	15
4.3.2 Fagocytóza.....	16
4.3.3 Zánět.....	17
4.4 Neurotoxicita	20
4.4.1 Enzymy štěpící neurotransmitery	20
4.4.2 Neurotransmitery	21
4.4.3 Genová exprese	21
5. Závěr.....	23
Bibliografie.....	25

Seznam zkratek

AhR – arylový uhlovodíkový receptor,
(z angl. aryl hydrocarbon receptor)

ACh – acetylcholin

AChE – acetylcholinesteráza

AIF-1 – allograft inflammatory factor 1

ALP – alkalická fosfatáza

AOS – antioxidační enzymy,
(z angl. antioxidant system)

BAX – Bcl-2 související protein X

Bcl-2 – z angl. B-cell lymphoma

CAT – kataláza

clap – katepsin

CLR – C-lektinové receptory

CYCS – cytochrom c

DOP – dopamin

DR5 – z angl. death cell receptor 5

ERK – z angl. extracellular signal-regulated
kinase

GABA – kyselina gama-aminomáselná

GSH – glutathion

GSH-Px – glutathion peroxidáza

GST – glutathion S-transferáza

HDPE – vysokohustotní polyethylen
(z angl. high density polyethylen)

HSP – proteiny teplotního šoku
(z angl. heat shock proteins)

IgM – imunoglobulin M

il – interleukin

JNK – c-Jun NH2 terminální kináza

Kaspáza (CASP) - cystein-aspartátová proteáza

LDPE – nízkohustotní polyethylen
(z angl. low density polyethylen)

lys – lysozym

MAO – monoamin oxidáza

MAPK – mitogenem aktivované proteinkinázy,
(z angl. mitogen-activated protein kinases)

MDA – malondialdehyd

MN – mikronukleus

NBUD – nuclear buds

NF-κB – nukleární faktor κ B

NPB – chromatidové mosty,
(z angl. nucleoplasmic bridges)

ODD – oxidativní poškození DNA,
(z angl. oxidative DNA damage)

PE – polyethylen

PMMA – polymethylmetakrylát

PNS – periferní nervová soustava

POPs – perzistentní organické polutanty

PP – polypropylen

prdx1 – peroxiredoxin 1

PRRs – z angl. pattern recognition receptors

PS – polystyren

PS-COOH – polystyren s připojenými
karboxylovými skupinami

PS-NH₂ – polystyren s připojenými
aminoskupinami

PVC – polyvinylchlorid

ROS – reaktivní formy kyslíku

SER – serotonin

SOD – superoxid dismutáza

TLR – Toll-like receptory

TNF-α – faktor nádorové nekrózy α

1. Úvod

Termín „mikroplasty“ byl zaveden roku 2004 mořským biologem, britským profesorem Richardem C. Thompsonem. Ačkoliv jsou mikroplasty a nanoplasty v přírodě přítomné už dlouhou řadu let, teprve s jejich rapidně stoupající koncentrací za poslední roky, tudíž jejich všudypřítomností a zlepšující se technologií detekce vyvstávají otázky ohledně toho jak a kde se nano a mikroplasty do přírody dostávají, ohledně toxicity a jejich osudu v životním prostředí.

Jako mikroplasty se označují různě tvarované úlomky plastů o velikosti pod 5 mm. Mikroplasty se dělí na primární a sekundární. Primární mikroplasty jsou takové plasty, které se využívají v průmyslu ve formě plastových pelet nebo jako prekursorů v kosmetickém průmyslu. Dostávají se do přírody majoritně odpadními vodami. Sekundární mikroplasty jsou plasty vzniklé degradací makroplastů, plastových produktů vyskytujících se v přírodě vlivem lidské činnosti.

Nanoplasty, jak už název napovídá, jsou menší částice než mikroplasty. Jejich velikost se pohybuje od 1 do 100 nm. Nanoplasty buď vznikají další degradací mikroplastů nebo jsou uvolňovány přímo do prostředí například z kosmetických produktů, barev a lepidel.

Důvodem, proč jsou nano a mikroplasty dnes tak diskutované, je jejich stabilita v prostředí a malá velikost díky čemuž se mohou stát potravou například pro drobné vodní živočichy. Shrnout jaký dopad mají nano a mikroplasty na živočichy na buněčné úrovni je cílem této práce.

Práce je zaměřená na molekulární mechanismy toxicity nano a mikroplastů, což znamená především indukci oxidativního stresu a s tím svázanou změnu genové exprese, účinek na metabolismus a genotoxicitu (mutagenezi). Důležité jsou ovšem i odpovědi imunitního systému, neurotoxicita nano a mikroplastů, o kterých práce také pojednává.

2. Mikroplasty a nanoplasty

2.1 Mikroplasty

Mikroplasty jsou polymerní odolné perzistentní částice o definované velikosti menší než 5 mm. (NOAA,2008). Jedná se majoritně o polymerní sloučeniny styrenu (PS), ethylenu (PE), propylenu (PP), a vinylchloridu (PVC), které mohou být v prostředí detekované. Mikroplasty jsou nacházeny v celé biosféře Země, která zahrnuje oceány (Desforges *et al.*, 2014; Mountford a Maqueda, 2019), sladkovodní plochy (Wang *et al.*, 2018; Vaughan *et al.*, 2017) a toky (Peng *et al.* 2018; Wang *et al.*, 2017), terestrické ekosystémy (Nizzetto *et al.*; 2016, Rillig *et al.*, 2017) i atmosféru (Dris *et al.*, 2016). Nebezpečí mikroplastů netkví jen v jejich všudypřítomnosti, ale také v chemické stálosti, schopnosti sorbovat perzistentní organické polutanty (POPs) (Zhan *et al.*, 2016), těžké kovy (Gao *et al.*, 2019) a patogeny (Viršek *et al.*, 2017), akumulovat se v orgánových soustavách organismů (Hu *et al.*, 2016) a penetrovat do buněk (Von Moos *et al.*, 2012).

Mikroplasty jsou děleny dle způsobu jakým vznikají a vstupují do životního prostředí na primární a sekundární. Zdroji primárních mikroplastů mohou být kupříkladu, kosmetické produkty (Fendall a Sewell, 2009), praní prádla ze syntetických vláken (Napper a C. Thompson, 2016) a mikroplasty uvolněné z pneumatik vozidel (Knight *et al.*, 2020). Primární mikroplasty jsou do prostředí vypouštěny přímo lidskou činností. Sekundární mikroplasty vznikají rozkladem makroplastů, které se již v přírodě vyskytují. K rozkladu makroplastů na mikroplasty sekundární dochází mechanicky, například abrazí za přispění písku a vody, působením mikroorganismů nebo fyzikálních faktorů jako je teplo a UV záření (Mailhot *et al.*, 2000). Prozatím prokázaná toxicita mikroplastů spočívá zejména ve schopnosti indukovat oxidativní stres projevující se například nevyváženou aktivitou antioxidantních enzymů.

2.2 Nanoplasty

Jako nanoplasty jsou označovány obvykle polymerní částice o velikosti menší než 0,1 μm . Dle definice se nanoplastem nazývají takové mikroplasty, které mají nanometrové velikosti. Definice rozdělení není však ustálená, a proto v některých vědeckých člancích označují i například 50 nm částice jako mikroplasty. Výskyt mikroplastů v nanometrovém měřítku tedy do určité míry koreluje s výskytem mikroplastů v mikrometrovém měřítku. Protože se však částice o velikosti 0,1 μm a menší významně liší svým působením na organismy, je v této práci užíván termín nanoplast pro fragmenty plastu menší než 0,1 μm . Ke vzniku nanoplastů dochází rozpadem mikroplastů i makroplastů (Lambert a Wagner, 2016) působením stejných faktorů působících při rozpadu makroplastů na sekundární mikroplasty. Do prostředí se mohou nanoplasty dostat i přímo lidskou činností. Nanoplasty jsou obecně považovány za nebezpečnější než mikroplasty. Nanoplasty mají oproti mikroplastům větší specifický povrch, na který se tedy mohou sorbovat POPs, těžké kovy a patogeny ve větší míře. Tyto sorbované látky mohou zapříčiňovat vyšší odezvu organismu než nanoplasty nebo

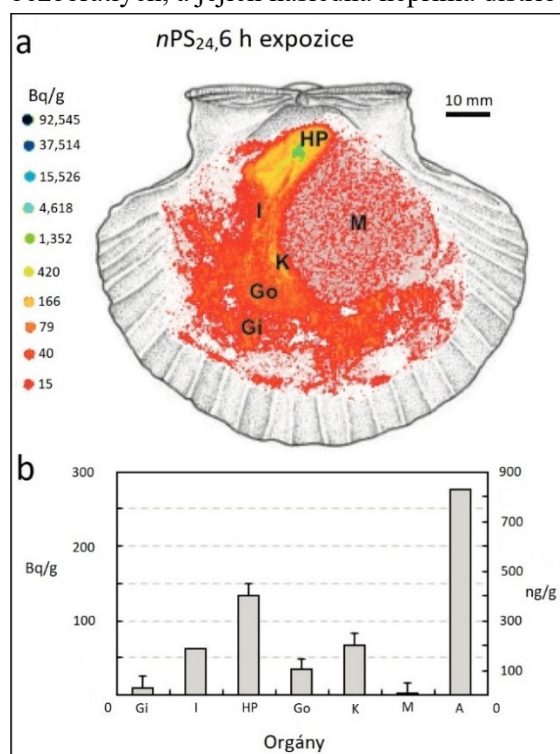
mikroplasty samotné. Druhým důvodem, proč mohou být nanoplasty považovány za toxičtější je jejich velikost, která jim pravděpodobně umožňuje snadnější průnik přes buněčnou lipidickou membránu. Další nevýhodou je nesnadná detekce nanoplastů.

3. Průnik mikroplastů a nanoplastů do buňky

Před samotným průnikem mikroplastů a nanoplastů do buňky nejprve musí dojít ke vstupu částic do organismu, akumulaci a případné distribuci mikroplastů nebo nanoplastů v orgánových soustavách organismů. Způsob vstupu, místo akumulace a případná distribuce záleží na typu organismu (Messinetti *et al.*, 2019).

U mořské okurky *Holothuria cinerascens* například existují dvě cesty, kterými se mikroplasty mohou do živočicha dostat. Zaprvé při dýchání, zadruhé při příjmu potravy (Iwalaye *et al.*, 2020). Způsob, jakým jednotlivé organismy přijímají mikroplasty je důležitý a souvisí s pozdější akumulací mikroplastů. Torn (2020) publikoval článek o požití mikroplastů krabem *Rhithropanopeus harrisii* a následné akumulaci mikroplastů ve střevě.

Z distribuce mikroplastů a nanoplastů v rámci orgánové soustavy může být vyvozen potenciální mechanismus, jakým se mikroplasty dostávají do buněk. Al-Sid-Cheikh *et al.* (2018) publikovali článek o celkové distribuci nanoplastů v hřebenatce *Pecten maximus* (viz Obrázek 1). K akumulaci nanoplastů docházelo u hřebenatky v trávicím systému. Později došlo k translokaci nanoplastů do oběhového systému a dále do ledvin a svalů. Tato fakta poukazují na pravděpodobnost penetrace nanoplastů lipidickou membránou epiteliálních buněk. Druhou možností, jak vysvětlit přítomnost nanoplastů v orgánových soustavách hřebenatky, je endocytóza nanoplastů do hemocytů, imunitních buněk bezobratlých, a jejich následná nepřímá distribuce.

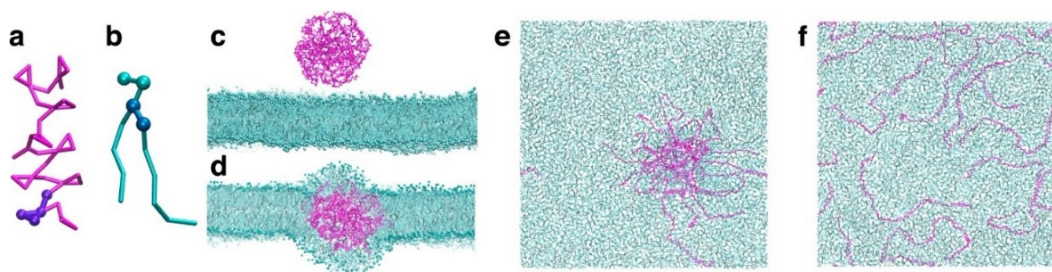


Obrázek 1 Příjem 24nm PS nanočástic. a) Distribuce v tkáních ukázaná pomocí kvantitativní celotělové autoradiografie v hřebenatce *P. maximus* po 6hodinové expozici. b) Kvantifikace radioaktivity naměřené v tkáních (vodorovná osa, orgány; Gi: žábry, I: střevo, HP: hepatopankreas, Go: gonády, K: vylučovací soustava, M: sval, A: řiť), (levá osa Bq/g, S/N_{norm} ; pravá osa, ng/g), (Převzato a upraveno dle (Al-Sid-Cheikh *et al.*, 2018).

Důkazem o přijímání nanoplastů endocytickou drahou jsou výsledky v publikaci (Von Moos *et al.*, 2012), kde prokázali přítomnost nanoplastů v endocytických váčcích epiteliálních buněk trávicího systému slávky *Mytilus edulis*. Dále byla prokázána i akumulace mikroplastů v lysozomech buněk sekrečních žláz trávicího systému slávky *M. edulis*, což potvrzuje účast mikroplastů v endocytóze. V lysozomech dochází k akumulaci nanoplastů a narušení stability lysozomální membrány (Salvati *et al.*, 2011; Von Moos *et al.*, 2012). Dle velikosti, tvaru a přítomnosti sorbovaných látek na povrchu by mohly nanoplasty a mikroplasty vstupovat do buněk všemi třemi typy endocytózy (Messinetti *et al.*, 2019; Park *et al.*, 2020). Pinocytózou, tedy neselektivní endocytózou. Fagocytózou by do buňky mohly vstupovat mikroplasty, které se svou velikostí podobají virům a bakteriím. Nelze ovšem vyloučit i možnost, kdy se do fagozomu společně s fagocytovanou částicí dostanou i nanoplasty. Zajímavá je i otázka, zda by do buňky mohly vstoupit mikroplasty či nanoplasty receptorově zprostředkovanou endocytózou.

Bylo publikováno, že při průniku plastových částic o velikosti 100 nm a 1 μ m do buňky hrají roli zejména fagocytóza a receptory zprostředkovaná endocytóza za pomoci klatrinových či caveolinových váčků. Po inhibici těchto cest klesla internalizace těchto 100nm a 1 μ m částic pod 50 %. Internalizace 50nm částic PS nanoplastů ovšem po inhibici endocytických cest neklesla pod 50 %, což naznačuje možný průnik takto malých částic přes lipidickou membránu, a tedy větší nezávislost průniku na endocytických drahách (Sendra *et al.*, 2020). Na druhou stranu v práci nebylo zmíněno, jakým podílem se na transportu nanoplastů do buňky podílí makro a mikropinocytóza. Je otázkou, zda nehrála makro a mikropinocytóza roli při transportu 50nm PS částic do buňky při inhibici ostatních endocytických drah a pokud ano, z jak velké části se podílela. Internalizace větších částic nanoplastů klesla pod 50 %, zbylá procenta částic musela nejspíše pinocyticky penetrovat do buněk. Další možnost průniku by byla přes membránu. Tyto domněnky nejsou v práci ničím podloženy, proto by téma potřebovalo doplnit o další výzkumné práce.

Nanoplasty mimo svou schopnost přecházet do buněk přes membrány, dokáží interagovat s dvouvrstvou fosfolipidů (viz Obrázek 2). Při inkorporaci nanoplastů do membrány dochází k destabilizaci membrány, narušení uspořádání fosfolipidů a rozrušení membránových raftů (Rossi *et al.*, 2014; Von Moos *et al.*, 2012).



Obrázek 2 Nanočástice PS vstupují do lipidových membrán a rozpouštějí se. a) Coarse-grained model PS10. Každý monomer se skládá z jedné kosterní kuličky a třech kuliček prstencových. Jeden monomer PS10 je zvýrazněn fialovou barvou. b) CG model POPC lipidu. Dvě kuličky s polární hlavou a glycerolové kuličky jsou zobrazeny v 3D modelu. c) Boční pohled na 11 řetězců PS100 ve vodní fázi (voda není zobrazena), v blízkosti POPC membrána v čase $t=0$. d) stejný systém jako v panelu c, po 1 μ s, e) po 5 μ s pohled shora, f) po 10 μ s pohled shora, agregát zcela rozpouštěn (Rossi *et al.*, 2014).

4. Příčiny působení MP a NP

Bylo publikováno mnoho prací o příčinách působení mikroplastů a nanoplastů na buňky organismů na molekulární úrovni. Určit jednu dráhu působení není možné. Ve výzkumných pracích figuruje řada proměnných, díky kterým nelze výsledky výzkumů porovnávat. Tyto proměnné zahrnují, jaká velikost, jaký typ plastů byl použit a jestli byl modifikován, koncentrace a čas, po který byl organismus částicím vystaven, a nakonec na jakém modelovém organismu byl účinek zkoumán. Většina prací se ovšem shoduje v tom, že primární prokázanou příčinou působení mikroplastů a nanoplastů u většiny organismů je indukce oxidativního stresu.

4.1 Oxidativní stres

Oxidativní stres je stav charakterizovaný disbalancí koncentrace reaktivních forem kyslíku (ROS, z angl. reactive oxygen species) a koncentrace antioxidačních enzymů redukujících ROS, souhrnně antioxidační systém (AOS) na nereaktivní formy sloučenin. Mezi ROS patří superoxidový radikál ($O_2^{\bullet-}$), peroxid vodíku (H_2O_2), hydroxylový radikál (OH^{\bullet}) a reaktivní formy dusíku jako je oxid dusnatý (NO^{\bullet}), oxid dusičitý (NO_2^{\bullet}) nebo peroxyinitrit ($ONOO^-$). Hlavním producentem ROS v buňce jsou mitochondrie, $O_2^{\bullet-}$ konkrétně vzniká při oxidativní fosforylaci na I a III komplexu. Mezi další zdroje $O_2^{\bullet-}$ patří endoplasmatické retikulum, NADPH oxidáza a cytochrom P450. Tyto formy kyslíku jsou velmi reaktivní, reagují s buněčnými biopolymery a zapříčiňují poškození DNA, proteinů a lipidů. Aby k těmto poškozením nedocházelo, existují antioxidační enzymy, které katalyzují redukci reaktivních forem kyslíku na peroxid vodíku a následně na vodu. Superoxid dismutáza (SOD) katalyzuje redukci $O_2^{\bullet-}$ na H_2O_2 , kataláza (CAT) a glutathion peroxidáza (GSH-Px) katalyzují přeměnu H_2O_2 na H_2O . Důležitou roli v reakcích odstraňujících ROS hraje glutathion (GSH), který v reakci s radikálem funguje jako donor vodíku, sám se oxiduje a radikál je redukován. Pokud není dostatečná funkce CAT a GSH-Px, přebytečný H_2O_2 reaguje s Fe^{2+} ve Fentonově reakci za vzniku extrémně reaktivního hydroxylového radikálu (OH^{\bullet}), který poté reaguje s vyššími mastnými kyselinami, dochází k rozkladu vyšších mastných kyselin a uvolnění malondialdehydu (MDA) (Burton a Jauniaux, 2011).

Indikátorem oxidativního stresu může být zvýšená koncentrace ROS, abnormální koncentrace AOS nebo produkty reakcí ROS s biopolymery.

4.1.1 Vznik reaktivních forem kyslíku

Přesný mechanismus vzniku ROS po vystavení organismu mikroplastům či nanoplastům zatím nebyl popsán. Byla jen detekována zvýšená koncentrace ROS a depolarizace mitochondriální membrány. Po vystavení rozsivky *Phaeodactylum tricornutum* 50 a 100nm PS nanoplastům byla detekována depolarizace membrány mitochondrií i zvýšená koncentrace ROS (Sendra *et al.*, 2019). Dále v publikaci bylo uvedeno, že po 24 hodinách měly 50nm částice větší účinek na depolarizaci membrány než 100nm plastové částice za stejnou dobu. Ovšem po 72 hodinách působení PS nanoplastů byla zaznamenána větší depolarizace mitochondriální membrány způsobená 100nm částicemi v porovnání s mírou depolarizace způsobenou 50nm částicemi ve stejnou dobu.

Na depolarizaci mitochondriální membrány nemají vliv jen nanoplasty, ale i mikroplasty. Práce (Wu *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020) dokazují stejnou závislost velikosti částic na míře depolarizace mitochondriální membrány. Čím větší je částice, tím větší by tedy mohla být depolarizace mitochondriální membrány. V obou pracích byly pro výzkum použity lidské buňky adenokarcinomu Caco-2. Wu *et al.* (2019) vystavili tyto buňky PS nanoplastům (0,1 μm ; 1, 10 a 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a mikroplastům (5 μm , 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$) po dobu 12 hodin. Wang *et al.* (2020) stejné buňky vystavili PS mikroplastům (300 nm, 500 nm, 1 μm , 3 μm , 6 μm , 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$) po dobu 24 hodin. Opačný účinek měly jiné nanoplasty na změnu mitochondriálního membránového potenciálu buněk řas. Gomes *et al.* (2020) a Wang *et al.* (2020) popsali hyperpolarizaci mitochondriální membrány, tedy zvýšení membránového potenciálu u skryténky *Rhodomonas baltica* po vystavení 50nm polymethylmetakrylátu (PMMA) upraveného karboxylovou skupinou o koncentraci od 0,5 do 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, po dobu 72 hodin a u řasy *Platymonas helgolandica* po vystavení 70nm PS částicím o koncentraci 20, 200 a 2000 $\mu\text{g}/\text{l}$ po dobu 4 dní. Důkazem, že se nejedná o vlastnost pouze nanoplastů a že tento jev se týká i materiálově odlišných nanočástic je práce (Liu *et al.*, 2018), která popisuje hyperpolarizaci mitochondriální membrány zelenivky *Scenedesmus obliquus* nanočásticemi TiO_2 , SiO_2 , a ZrO_2 .

Mitochondrie nejsou jediným zdrojem ROS v buňce. Výše byly popsány práce, které naznačují možnou souvislost mezi poškozením mitochondrií a zvýšenou koncentrací ROS. ROS vznikají ale také v endoplasmatickém retikulu. Pokud částice do buňky vstoupí kaveolinem zprostředkovanou endocytózou, dochází k jejich akumulaci v endoplasmatickém retikulu. Sendra *et al.* (2020) pozorovali pomocí konfokálního mikroskopu obarvené částice PS nanoplastů nashromážděné okolo jádra buněk hemocytů slávky *Mytilus galloprovincialis*. Mohlo by tedy též docházet k destabilizaci a poškození membrány endoplasmatického retikula a zvýšení koncentrace ROS.

4.1.2 Genová exprese

Důsledkem oxidativního stresu je obecně spuštění mitogenem aktivovaných proteinkinázových drah (MAPK) (Han *et al.*, 2019), které například mohou indukovat transkripci genů pro antioxidační enzymy. Po vystavení organismu mikroplastům i nanoplastům byla detekována zvýšená i snížená transkripce či aktivita genů pro komponenty MAPK drah (Jeong *et al.*, 2017; Qu *et al.*, 2018). Tang *et al.* (2018) v práci detekovali zvýšenou expresi genů pro JNK (c-Jun NH_2 terminální kináza) dráhu a sníženou expresi genů pro ERK (kináza regulovaná extracelulárním signálem) dráhu, která má vliv na indukci apoptózy, po vystavení pórovníku *Pocillopora damicornis* 1 μm PS mikroplastům. JNK dráha má dále za příčinu aktivaci transkripce genů pro antioxidační enzymy, což potvrzuje detekovaná zvýšená aktivita enzymů SOD a CAT. Proč se v buňkách pórovníku nespustila apoptotická dráha není vysvětleno. Pravděpodobně byl organismus vystaven takové koncentraci PS mikroplastů (50 mg/l), která neindukovala tak velké poškození, nebo byl organismus vystaven této koncentraci po krátkou dobu (12 hodin). V jaké míře bude docházet k transkripci genů pro komponenty signálních kaskád nebo v jaké míře budou proteiny fosforylovány, závisí na velikosti částic působících

na organismus. U vířníka *Brachionus koreanus* vystaveného PS částicím o velikosti 0,05; 0,5 a 6 µm při koncentraci 10 mg/ml po dobu 24 hodin byla detekována výrazná fosforylace JNK a p38. Dráha ERK nebyla výrazněji fosforylována ani při jedné ze zkoumaných koncentrací různě velkých PS částic (Jeong *et al.*, 2016).

4.1.3 Enzymy antioxidačního systému

Bylo publikováno mnoho prací, které dokazují vznik oxidativního stresu způsobeného přítomností vyššího množství ROS pomocí detekce aktivity AOS. Yu *et al.* (2018) ve své práci dokazují zvýšenou aktivitu SOD, GSH a GSH-Px v buňkách jater kraba *Eriocheir sinensis* vystaveného malým koncentracím (40 a 400 µg/l) PS mikroplastů o velikosti 0,5 µm po dobu 7 dní. Zároveň v práci popisují snížení aktivity antioxidačních enzymů po vystavení kraba *E. sinensis* vyšším koncentracím (4000 a 40 000 µg/l) PS mikroplastů o stejné velikosti po stejný čas.

Opačné výsledky publikovali ve své práci Rodríguez-Seijo *et al.* (2018). Žížala *Eisenia fetida* byla vystavena po dobu 28 dní různým koncentracím nízkohustotních PE (LDPE) mikroplastů o velikosti od 250 µm do 1000 µm. Byly pozorovány aktivity antioxidačních enzymů CAT a glutathion S-transferázy (GST). V průběhu pokusu nebyly pozorovány výrazné změny v aktivitě CAT, jen při druhé nejnižší koncentraci 125 mg částic/kg suché zeminy byla pozorována redukce v aktivitě CAT. Naopak zvýšení aktivity GST bylo pozorováno za nejvyšší koncentrace 1000 mg částic/kg suché zeminy, kdy byly detekovány rovněž molekuly MDA naznačující poškození lipidických membrán (Wan *et al.*, 2019). Tyto výsledky poukazují na to, že toxicita mikroplastů je nejen závislá na koncentraci, ale také na druhu organismu vystaveného plastovým částicím.

Po vystavení zebřičky *Danio rerio* rozdílně velkým PS mikroplastům v různých koncentracích po dobu 7 dní byly sledovány aktivity antioxidačních enzymů CAT a SOD v jaterních buňkách. Zvýšená aktivita SOD i CAT byla pozorována po vystavení organismu oběma koncentracím (200 a 2000 µg/l) jen v případě větších 5µm částic PS mikroplastů. V případě 70nm částic byla zvýšená aktivita AOS detekována jen při koncentraci 2000 µg/l (Lu *et al.*, 2016). Což potvrzuje, že ovlivnění aktivit AOS tedy není závislé jen na koncentraci částic, ale také na velikosti částic (Choi *et al.*, 2020; Jeong *et al.*, 2016). V neposlední řadě je čas faktorem, který ovlivňuje aktivitu AOS. V publikaci (Ribeiro *et al.*, 2017) se v čase lišila míra aktivity sledovaných enzymů. Nejvýraznější nárůst aktivity GST se projevil po 14 dnech působení 20µm PS mikroplastů na skrobikulu *Scrobicularia plana*. U SOD byla detekovatelná vyšší aktivita v 7., 14. a 21. dnu. V práci je zmíněna i orgánová specifita. Aktivita GST v žaberních buňkách stoupla po 14 dnech, zatímco v trávicí soustavě byla detekovatelná spíše snížená aktivita GST ve 3. a 21. dnu.

4.1.4 Proteiny teplotního šoku

Proteiny teplotního šoku (HSP, z angl. heat shock proteins) mohou sloužit jako další indikátor oxidativního stresu. Zvýšená koncentrace ROS indukovaná přítomností mikroplastů a nanoplastů v organismu je nejspíše důvodem nestability proteinů, a tedy zvýšené koncentrace HSP. HSP je skupina

proteinů, která se váže na nesbalené proteiny a tím je chrání nebo napomáhá správnému skládání proteinů. Vyšší aktivita, nebo exprese genů pro různé rodiny HSP je spojena se stresovými podmínkami, jakými jsou například vysoká teplota, UV, nebo vystavení buněk těžkým kovům (Kim *et al.*, 2014; Rhee *et al.*, 2009). Nejčastěji se jako indikátorů stresových podmínek používá nejvíce zastoupených cytosolických proteinů HSP70 a HSP90.

Ukázalo se, že mikroplasty a nanoplasty v živočišných buňkách ovlivňují expresi genů pro HSP (Imhof *et al.*, 2017). Byla dokázána jak zvýšená exprese genů pro HSP (Brandts *et al.*, 2018b; Bergami *et al.*, 2019b; Eom *et al.*, 2020), tak snížená exprese genů pro HSP (Prendergast-Miller *et al.*, 2019; Limonta *et al.*, 2019; Espinosa *et al.*, 2019). Za určitých podmínek neměly plastové částice na expresi genů pro HSP vliv žádný (Brandts *et al.*, 2018a). U perloočky *Daphnia pulex* byla prokázána zvýšená i snížená exprese genů pro HSP70 a HSP90. Liu *et al.* (2019) vystavili perloočku PS nanoplastům o velikosti 75 nm po dobu 48 hodin. Poté byla detekována zvýšená exprese *hsp70* při koncentracích PS částic 1 mg/l a 2 mg/l. Zvýšená exprese *hsp90* se projevila jen při koncentraci 2 mg/l PS částic. Podobný výsledek byl publikován Liu *et al.* (2018) i o rok dříve, kdy za využití stejného typu i velikosti plastu byly vystaveny perloočky staré 1, 4, 7, 14 a 21 dní PS nanoplastům o koncentraci 0,1 a 1 mg/l po dobu 48 hodin. Exprese genů pro HSP70 i HSP90 byla signifikantně zvýšená jen u perlooček starých 21 dní při obou koncentracích. Perloočky staré 1 a 7 dní vykazovaly jen mírně zvýšenou expresi genů pro HSP70 a HSP90 při obou koncentracích. Naopak snížená exprese genů *hsp70* a *hsp90* byla detekována u perlooček starých 4 a 14 dní. Je tedy možné, že účinek plastových částic by mohl být závislý i na stáří organismu. V práci (Liu *et al.*, 2018) je uvedena hypotéza, která dává do souvislosti zvýšenou expresi genů pro HSP70 a HSP90 u starších perlooček se stárnutím vlivem zvyšující se koncentrace ROS v tělech živočichů. Vyšší koncentrace ROS u starších organismů zapříčiněná stářím a poškozením organismu by tedy mohla navyšovat celkový počet ROS po vystavení organismu plastovým částicím. To by se poté mohlo odrazit na zvýšené expresi genů pro HSP.

Exprese genů pro HSP není závislá jen na stáří organismu, ale také na čase. U žábřonožky *Artemia franciscana* vystavené PS nanoplastům s připojenými aminoskupinami (PS-NH₂) o velikosti 50 nm byla zaznamenána časová i koncentrační závislost exprese genů *hsp70* a *hsp26*. Po 48 hodinách byla exprese *hsp70* a *hsp26* signifikantně zvýšena při koncentraci 1 µg/ml. Ovšem po 14 dnech vykazovaly zvýšenou expresi genu *hsp70* jen žábřonožky vystavené koncentraci nanoplastů 0,1 µg/ml, exprese *hsp26* nebyla při žádné z koncentrací po 14 dnech ovlivněna (Varó *et al.*, 2019). Také u buněk v ledvinách mořana *Sparus aurata* byla zjištěna časová a koncentrační závislost exprese genů pro HSP70 a HSP90. Mořan byl vystaven PVC mikroplastům (40-150 µm) o dvou koncentracích (100 a 500 mg/kg krmiva) po dobu 15 a 30 dní. Výrazná exprese genu pro HSP90 byla zaznamenána po 15 dnech při koncentraci 100 mg/kg krmiva, po 30 dnech při koncentraci 500 mg/kg krmiva. Naopak exprese genu pro HSP70 nebyla po 15 dnech ani za jedné koncentrace výrazně ovlivněna a po 30 dnech byla dokonce zaznamenána snížená exprese při koncentraci 500 mg/kg krmiva (Espinosa *et al.*, 2017b).

Velmi zajímavá by mohla být i spojitost mezi zvýšeným počtem HSP a stimulací imunitního systému (Tang *et al.*, 2012). Bylo prokázáno, že organismus vystavený bakteriím či toxinům, obecně stresovým podmínkám, vykazuje vyšší expresi genů pro HSP (Wang *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2006). HSP pak hrají roli při aktivaci imunitní odpovědi, mohou fungovat jako signál nebezpečí a tím organismus chránit (Campisi *et al.*, 2003). Po působení plastových částic na organismus zatím nebyla tato spojitost mezi zvýšenou expresí genů pro HSP a stimulací imunitního systému potvrzena.

4.1.5 Cytochrom P450

Cytochrom P450 je rozsáhlá skupina monooxygenázových enzymů, při jejichž reakci dochází k přechodnému výskytu superoxidového radikálu. Jak se ukazuje z vědeckých prací, v odpovědi na mikroplasty a nanoplasty ovšem nejsou dalším zdrojem ROS. Buňka se spíše snaží chránit pomocí cytochromu P450, tedy zahájit detoxifikaci. Ding *et al.* (2018) v práci popisují závislost aktivity enzymů Ethoxyresorufin- O -deethylázy (EROD) a benzyloxy-4-trifluoromethylcoumarin-O-debenzyloxylázy (BFCOD) na čase a koncentraci (1, 10, 100 µg/l) po vystavení tlamouna *Oreochromis niloticus* 0,1µm PS nanoplastům. Během 6 dnů zaznamenali sníženou aktivitu enzymů a zvýšenou aktivitu zaznamenali během 10. a 14. dne. Proč došlo nejprve ke snížení aktivity ve své práci zdůvodňují hypotézou, že v prvních dnech mohlo dojít k porušení enzymové aktivity a membrán organel, a tedy ke snížení aktivity enzymů EROD a BFCOD. Ke zvýšení aktivit enzymů mohlo dojít po adaptační fázi.

Míra exprese genů pro cytochrom P450 je závislá na koncentraci částic působících na organismus (Wu *et al.*, 2019). Nutno zdůraznit, že projev exprese genů při dané koncentraci částic u určitého druhu se může také lišit v různých orgánových soustavách. U zebřičky *D. rerio* po vystavení směsi PS částic o různé velikosti došlo k signifikantnímu nárůstu exprese genu *cyp1a* jen při koncentraci 110 částic/l, a to jen ve střevě (Mak *et al.*, 2019). Jakým mechanismem způsobují mikroplasty a nanoplasty zvýšenou či sníženou aktivitu cytochromu P450 zatím není zcela objasněno. K aktivaci cytochromu P450 dochází většinou v přítomnosti polycyklických aromatických uhlovodíků, dioxinů nebo fenolů pomocí arylového uhlovodíkového receptoru (AhR). AhR funguje jako transkripční faktor a indukuje transkripci genů pro příslušnou skupinu cytochromu P450. V případě, že by na mikroplastech nebo nanoplastech byly sorbovány polutanty jako jsou například polycyklické aromatické uhlovodíky, mohlo by k aktivaci cytochromu P450 docházet výše popsáním způsobem přes AhR receptor. V případě čistých PE mikroplastů bez sorbovaných látek ovšem také docházelo ke zvýšené transkripci genu *cyp1a1*. Byla publikována hypotéza, že při výskytu PE mikroplastů v kyselém prostředí žaludku larvy mořčáka *Dicentrarchus labrax* mohlo dojít k částečnému natrávení PE mikroplastů a tím k vytvoření toxických produktů reagujících s AhR receptory (Mazurais *et al.*, 2015).

4.1.6 Apoptóza

Apoptóza (programovaná buněčná smrt) je soubor mechanismů, které vedou k eliminaci buněk poškozených nebo nepotřebných. Programovaná buněčná smrt může být aktivována cestou vnitřní (intrinsickou) pomocí stresových faktorů uvnitř buňky. Takovými stresovými faktory mohou být

zvýšená koncentrace Ca^{2+} , NO nebo ROS. Buňka může také přijmout signál ke spuštění apoptózy zvenčí, v takovém případě se jedná o aktivaci cestou vnější (extrinsickou). K tomuto účelu je buňka vybavena receptory pro ligandy spouštějící apoptózu na základě dění v organismu. Takovými ligandy mohou být Fas ligand nebo faktor nádorové nekrózy α (TNF- α). Jako indikátory buněčné programované smrti mohou sloužit zvýšené koncentrace nebo zvýšená exprese genů pro proteiny účastníci se intrinsických i extrinsických apoptotických drah a také fosfatidylserin vystavený na vnější straně cytoplasmatické membrány buňky (Elmore, 2016).

V závislosti na typu endocytické dráhy, kterou nanoplasty či mikroplasty vstoupí do buňky dochází k akumulaci a ovlivnění funkce jiných buněčných organel. Pokud mikroplasty a nanoplasty vstoupí do buňky jakoukoliv endocytickou drahou nezávislou na kaveolinu, skončí tyto částice v lysozomech. V lysozomech se akumulují a zapříčiňují destabilizaci membrány (Von Moos *et al.*, 2012). Destabilizace a následná permeabilizace lysozomální membrány mohou být prvním krokem ke spuštění apoptotické dráhy (Xia *et al.*, 2008). (Wang *et al.*, 2013a) publikovali práci o působení 50nm PS-NH₂ nanoplastů o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ na lidské astrocytomární buňky. Po 3 až 6 hodinách byla detekována destabilizace lysozomální membrány a až po 8 hodinách i depolarizace membrány mitochondriální. Zároveň bylo po 6 až 8 hodinách detekováno uvolnění katepsinů B, D a L. Vzhledem ke schopnosti katepsinů aktivovat pro-apoptotické proteiny (Boya a Kroemer, 2008), je možné, že touto cestou mohlo dojít k porušení mitochondriální membrány, ke snížení membránového potenciálu a spuštění apoptotické dráhy závislé na mitochondriích. Dalším důkazem o destabilizaci lysozomální membrány pomocí PS-NH₂ nanoplastů je publikace (Canesi *et al.*, 2015), kde byla slávka *M. galloprovincialis* vystavena po dobu 30 minut PS-NH₂ nanoplastům o velikosti 50 nm při koncentracích 5 $\mu\text{g/ml}$ a 50 $\mu\text{g/ml}$. Po 45 minutách při koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ PS-NH₂ částic byl dále detekovatelný snížený membránový potenciál mitochondrií a fosfatidylserin na vnější straně cytoplasmatické membrány buněk, což dokazuje spuštění programované buněčné smrti vyvolané nanoplasty.

Proč po vystavení buněk PS-NH₂ plastovým částicím dochází k destabilizaci a porušení integrity membrány lysozomů by mohla vysvětlit teorie protonové houby (z angl. proton sponge theory), která je zmíněna v publikacích (Xia *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013b). Jednotlivé kroky k rozpadu lysozomální membrány i membrány endozomů by tedy podle této teorie mohly vypadat následovně. Po endocytóze plastových PS-NH₂ částic do buňky dochází k acidifikaci endozomů. Tím pádem by mohlo docházet k protonaci aminoskupin a alkalizaci endozomu, později po splynutí i k alkalizaci lysozomu. Alkalizace by mohla mít za následek zvýšenou činnost protonových pump pracujících na vyrovnání pH (Boussif *et al.*, 1995). Pro vyrovnání osmotického a elektrochemického gradientu vodíkové ionty následují chlorné ionty a voda (Sonawane *et al.*, 2002). To vše může vést ke zvětšení endozomů a lysozomů a jejich následnému prasknutí.

Pozoruhodné jsou tedy výsledky (Thubagere a Reinhard, 2010), kde byla detekována zvýšená aktivita cystein-aspartátové proteázy 3 (kaspáza 3) a přítomnost fosfatidylserinu na povrchu

cytoplasmatické membrány buněk po vystavení buněk lidského adenokarcinomu Caco-2 20nm PS nanoplastům s navázanými karboxylovými skupinami (PS-COOH) při koncentraci 6,6 nM. Jakým mechanismem dochází ke spuštění apoptotických drah po vystavení organismu PS-COOH, nebo nemodifikovaným plastovým částicím není objasněno.

V práci (Bexiga *et al.*, 2010) kromě morfologických změn lysozomů a mitochondrií po vystavení lidských astrocytomárních buněk 50nm PS-NH₂ částicím při koncentraci 50 µg/ml zaznamenali po 9 hodinách iniciační štěpení kaspázy 3, kaspázy 9 a po 6 hodinách štěpení poly(ADP-ribóza)-polymerázy. Nebylo ovšem zaznamenáno žádné štěpení kaspázy 8, což naznačuje, že apoptóza probíhala cestou intrinsickou. Zvýšená exprese genů pro proteiny účastnících se jak intrinsických, tak extrinsických apoptotických drah, je důkazem o spuštění programované buněčné smrti buňkami vystavenými plastovým částicím. (viz Tabulka 1, str. 12).

Tabulka 1 Ovlivnění exprese genů pro proteiny účastníci se apoptotických drah.

Živočich	Buněčný typ	Typ plastu	Velikost	Koncentrace	Čas expozice	Biomarker	Genová exprese	Citace
<i>Paracentrotus lividus</i>	-	PS-NH ₂	50 nm	3 µg/ml	24 h	CASP8	↑	(Della Torre <i>et al.</i> , 2014)
		PS-COOH	40 nm				-	
<i>T. granosa</i>	hemocyty	PS	30 µm	1 mg/l	4 dny	<i>bcl-2</i>	↑	(Tang <i>et al.</i> , 2020b)
						CASP3	↓	
<i>T. granosa</i>	hemocyty	PS	30 µm	0,26 mg/l	14 dní	CASP3	↑	(Sun <i>et al.</i> , 2020)
						BAX	↑	
<i>Homo sapiens sapiens</i>	linie alveolárních epiteliálních buněk A549	PS	25 nm, 70 nm	25 µg/ml, 160 µg/ml	2, 4, 8 h	BAX	↑	(Xu <i>et al.</i> , 2019)
						CASP3		
						CASP8		
						CASP9		
						DR5		
						CYCS		
<i>A. franciscana</i>	-	PS-NH ₂	50 nm	1µg/ml	48 h	<i>clap</i>	↑	(Bergami <i>et al.</i> , 2017)
<i>Rattus norvegicus domestica</i> , kmen Wistar	kardiomyocyty	PS	0,5 µm	5 mg/l, 50 mg/l	90 dní	BAX	↑	(Li <i>et al.</i> , 2020)
				50 mg/l		<i>bcl-2</i>	↓	
<i>Sterechinus neumayeri</i>	coelomycety	PS-COOH	40 nm	1µg/ml	6 h	CASP8	↑	(Bergami <i>et al.</i> , 2019c)
						<i>bcl-2</i>	↑	
					24 h	<i>bcl-2</i>	↑	
				5 µg/ml	6 h	BAX	↓	
					24 h	<i>bcl-2</i>	↑	
		PS-NH ₂	50 nm	1µg/ml	6 h, 24 h	<i>bcl-2</i>	↑	

Kaspáza (CASP), z angl. B-cell lymphoma (*bcl-2*), Bcl-2 související protein X (BAX), cytochrom c (CYCS), faktor nádorové nekrózy α (*tnfα*), z angl. death cell receptor 5 (*dr5*), katepsin (*clap*).

4.2 Genotoxicita

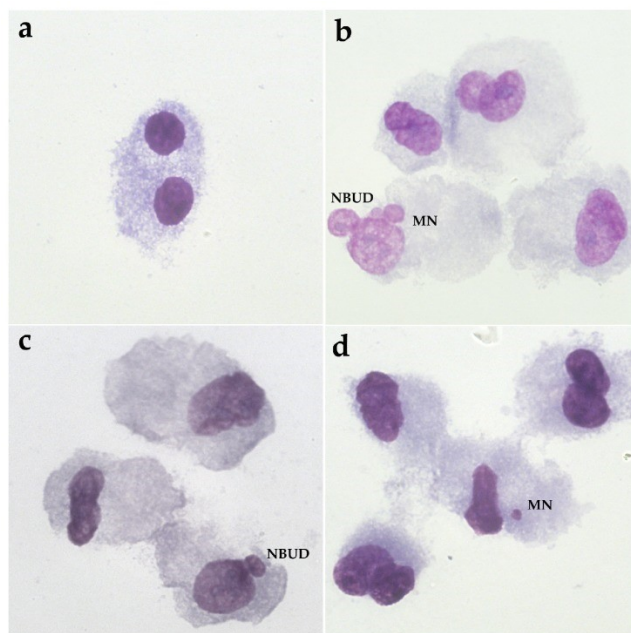
Genotoxicita, nebo též mutageneze je poškození struktury genetické informace organismu mutageny. Mutageny mohou být chemického, fyzikálního nebo biologického původu. Mikroplasty a nanoplasty se například společně s polychlorovanými bifenoly, řadí mezi mutageny chemické. Pro identifikaci nestability chromosomu a poškození DNA jsou jako indikátory využívány tzv. DNA tail, mikronukleus (MN), chromatidové mosty (NPB, z angl. nucleoplasmic bridges) a NBUD (z angl. nuclear buds). DNA tail je morfologickým projevem jednovláknových i dvouvláknových zlomů detekovaných na gelu při jednobuněčné gelové elektroforéze (z angl. comet assay) (Ashby *et al.*, 1995). Jako MN se označuje fragment chromozomu vzniklý při dělení buňky v anafázi viditelný pod mikroskopem jako malá část DNA vedle nově vzniklého jádra. MN se v buňce může také vytvořit v případě, že dojde ke dvouvláknovým zlomům DNA a následnému dělení buňky. Po vytvoření zlomů může také dojít k propojení sesterských chromatid a při následném dělení buňky ke vzniku NPB. NBUD je struktura morfologicky podobná MN, jen v kontaktu s chromosomální DNA. Přítomnost NBUD v buňce může buď předznamenávat vznik MN nebo může být projevem přerušení NPB. Všechny tyto abnormality mohou poukazovat na jednovláknové i dvouvláknové zlomy v DNA (Fenech, 2007).

Genotoxicita mikroplastů a nanoplastů není dostatečně zkoumaným tématem, které by poskytovalo dopodrobna vysvětlené molekulární mechanismy působení částic plastů na molekulu DNA. Publikované práce povětšinou poskytují základní spojitost mezi mikroplasty, nanoplasty a genotoxicitou detekovanou pomocí DNA tail či přítomností MN, NPB nebo NBUD (viz Obrázek 3), (Zheng *et al.*, 2019; Hamed *et al.*, 2020).

Byly publikovány práce, které prokazují závislost míry genotoxicity na koncentraci (Poma *et al.*, 2019), velikosti částic a na čase (Ribeiro *et al.*, 2017), po kterém je organismus mikroplastům či nanoplastům vystaven. Jiang *et al.* (2019) v článku popisují výskyt MN v závislosti na velikosti PS částic u bobu *Vicia faba*. Nanoplasty veliké 100 nm indukovaly vyšší genotoxicitu než 5µm mikroplasty. Zároveň jen 100nm částice vykazovaly vyšší genotoxicitu v závislosti na koncentraci. U 5µm mikroplastů nebyla zaznamenána výrazná změna genotoxicity v závislosti na stejných koncentracích, které byly využity u 100nm částic (10, 50, 100 mg/l). Naopak u žížaly *E. fetida* bylo detekováno vyšší poškození DNA většími částicemi PS plastů (1300 nm) než 100nm nanoplasty ve střevních buňkách (Jiang *et al.*, 2020). Mikroplasty a nanoplasty nemusí vždy způsobit poškození DNA. Cortés *et al.* (2020) po vystavení buněk lidského adenokarcinomu Caco-2 PS nanoplastům o velikostech 0,05-0,1 µm nezaznamenali žádnou znatelnou genotoxicitu, jen oxidativní poškození DNA (ODD, z angl. oxidative DNA damage). Ke stejnému závěru došli v práci Pittura *et al.* (2018), kde také nedetekovali žádnou signifikantní změnu v přítomnosti MN či ve tvorbě DNA tail po vystavení slávky *M. galloprovincialis* LDPE částicím o velikosti 20-25 µm o koncentraci 10 mg/l po dobu 28 dní.

K poškození DNA by pravděpodobně mohlo docházet dvěma způsoby. Prvním způsobem by bylo poškození DNA pomocí ROS (Avio *et al.*, 2015), obecně ODD. Druhým způsobem poškození by mohlo dojít přímým kontaktem mikroplastů či nanoplastů s molekulou DNA. Rubio *et al.* (2020) se v práci zaměřují na rozlišení genotoxicity od oxidativního poškození DNA PS nanoplasty (0,05-0,1 μm) o koncentraci 0-200 $\mu\text{g/ml}$ po dobu 24 a 48 hodin na třech typech hematopoetických lidských buněk (Raji-B – B-lymfocyty, TK6 – lymfoblasty, THP-1 – monocyty). K detekci oxidativně poškozené DNA byla použita formamidopyrimidin DNA glykosyláza převádějící oxidativní poškození na zlomy DNA, které lze detekovat pomocí jednobuněčné gelové elektroforézy. U buněk THP-1 nebyly zaznamenány žádné známky genotoxicity ani oxidativního poškození DNA za jakýchkoliv podmínek. Buňky TK6 nevykazovaly žádný signifikantní nárůst genotoxicity, ovšem po 24 hodinách při všech koncentracích byl zaznamenán nárůst oxidativního poškození DNA. Jak genotoxicita, tak ODD byly detekovány v buňkách Raji-B. Genotoxicita byla detekována po 24 i 48 hodinách při koncentracích 25 i 50 $\mu\text{g/ml}$. ODD bylo detekováno pouze po 24 hodinách jen při koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$. Z výsledků pro linii Raji-B tedy vyplývá, že poškození DNA není způsobené jen vlivem ROS, ale musí docházet k přímé interakci mezi nanoplasty a molekulou DNA. Proměnlivý účinek nanoplastů na různé typy buněk v publikaci připisují míře odolnosti jednotlivých leukocytických buněčných linií.

Hypotézu, že by částice plastů mohly interagovat se samotnou molekulou DNA podporují výsledky publikace (Cortés *et al.*, 2020). Zde byly detekovány fluorescenčně označené PS nanoplasty v jádře buněk lidského adenokarcinomu Caco-2.



Obrázek 3 Test z angl. cytokinesis-block micronucleus (CBMN) na buněčné linii lidských fibroblastů Hs27. Poškození DNA po vystavení buněk Hs27 PS nanoplastům (100 nm). a) Dvoujaderná buňka, b) buňky s MN a NBUD, c) buňka s NBUD, d) buňka s MN. Zvětšeno 100x (Poma *et al.*, 2019).

4.3 Imunotoxicita

Imunitní systém zajišťuje organismům integritu. Kromě toho, že chrání živočichy před působením vnějších činitelů, jakými jsou například patogenní mikroorganismy a různé druhy toxinů, zabezpečuje i likvidaci toxinů a apoptotických buněk vlastního organismu. Vůči organismu, který chrání, je imunitní systém tolerantní. Jsou rozeznávány dva mechanismy, kterými imunitní systém reaguje. Jedná se o nespecifický (vrozený) a specifický (získaný) typ mechanismu obrany. Jak nespecifická, tak specifická imunita má buněčnou a humorální (látkovou) složku. Buněčnou složku nespecifické imunity tvoří fagocytující a cytotoxické buňky, buněčnou složkou specifické imunity jsou hlavně T-lymfocyty. Humorální složkou nespecifické imunity jsou například interferony, lektiny a komplementový systém, humorální složku specifické imunity tvoří protilátky. Nespecifická imunita se od specifické liší svým evolučním stářím, rychlejší odpovědí na podnět a tím, že nemá imunologickou paměť. Mezi nespecifickou obranu organismu patří také epitelální tkáň, které chrání živočicha před přímým kontaktem se škodlivinami. Dále se do první obranné linie řadí různé sekrety a mikroflóra sliznic živočichů. Zda těla organismů vystavených mikroplastům a nanoplastům rozeznávají tyto částice jako cizorodé je tématem, které přitahuje pozornost. Je známo, že proti cizorodé látce, která vstoupila do organismu existuje několik drah odpovědi imunitního systému v závislosti na typu organismu. U bezobratlých živočichů dochází k melanizaci, u obratlovců k zánětu, k aktivaci komplementového systému, nebo v pozdější fázi k zapojení buněčné a humorální složky specifické imunity (Marshall *et al.*, 2018).

4.3.1 Identifikace částic buňkami imunitního systému

K identifikaci cizorodých látek v organismu slouží buňkám imunity PRRs (z angl. pattern recognition receptors). K takovýmto receptorům se řadí Toll-like receptory (TLR) nebo C-lektinové receptory (CLR), které se nachází v cytoplasmatické membráně buněk nespecifické imunity (buňky dendritické, makrofágy, neutrofily, monocyty). Po aktivaci těchto drah dochází až k transkripci genů pro prozánětlivé cytokiny.

Gardon *et al.* (2020) vystavili perlotvorku *Pinctada margaritifera* PS mikroplastům o velikosti 6 μm a 10 μm po dobu 2 měsíců. Pouze při koncentraci 0,25 $\mu\text{g/l}$ byla zaznamenána snížená exprese genu pro TLR13, který slouží k rozpoznání bakteriální 23S rRNA. Na druhou stranu byla zjištěna zvýšená exprese genu pro signální molekulu MyD88, která je součástí TLR signální dráhy. Prokázanou sníženou expresí genu pro TLR13 vyloučili možnost, že by ke zvýšení exprese genu pro MyD88 mohlo dojít pomocí bakterií. Jistým mechanismem tedy buňky imunitního systému musely rozeznat mikroplasty jako cizorodou částici. Vhodné by bylo na tento výzkum navázat a zjistit jaké další TLR mohou mikroplasty ovlivnit. Sníženou expresí genů pro TLR zaznamenali také Détrée a Gallardo-Escárate (2018) po 18denní expozici slávky *M. galloprovincialis* polyethylenovým částicím s vysokou hustotou (HDPE) 1-50 μm velkým při koncentraci 460 000 částic/l. Zdálo by se tedy, že HDPE mikroplasty u slávky *M. galloprovincialis* snižují expresi genů pro PRRs. Byla

ovšem detekována zvýšená exprese genu pro dva typy lektinu C. Stejný výsledek, tedy snížení exprese genu konkrétně pro TLR4 byl popsán také v publikaci (Tang *et al.*, 2020b), kde byla detekována snížená exprese genů pro signální molekuly TRAF6, IKK α a NF- κ B účastníci se TLR signální kaskády. Snížené exprese genů byly detekovány u návky *Tegillarca granosa* vystavené 500nm a 30 μ m PS mikroplastům o koncentraci 1mg/l po dobu 4 dní.

Dalším způsobem, kterým imunitní systém může identifikovat plastové částice, je pomocí imunoglobulinu M (IgM). IgM je protilátka, která hraje důležitou roli v primární imunitní reakci. Poté, co se IgM naváže na antigen, dokáže aktivovat komplementový systém. V kožním slizu mořčáka *D. labrax* byly naměřeny mírně vyšší koncentrace IgM. Mořčák byl vystaven PE a PVC mikroplastům velikým od 40 do 150 μ m při koncentraci 100 a 500 mg/kg krmiva po dobu 21 dní. Znatelně ovšem koncentrace IgM stoupla u mořčáků *D. labrax* vystavených těmito podmínkám: PE částice, 40-150 μ m, 500 mg/kg krmiva (Espinosa *et al.*, 2019). Zvýšenou koncentraci IgM v kožním slizu u mořana *S. aurata* v další publikaci zmiňují Espinosa *et al.* (2017a) a zároveň poukazují na možnou závislost zvyšující se koncentrace IgM na čase. U ryb vyživovaných krmivem doplněným o PVC částice veliké 40-150 μ m o koncentraci 500 mg částic/kg krmiva, byla sledována vyšší koncentrace IgM po 30 dnech než po 15 dnech. Naopak u larev zebřičky *D. rerio* po 7 dnech působení PS mikroplastů velikých 5 μ m o koncentraci 50 ng/ml, nebyly sledovány žádné signifikantní nárůsty v koncentraci IgM. Žádná z těchto prací zároveň nezkoumala vliv mikroplastů na části komplementu. V práci, kde se zaměřili na míru exprese isoform komplementového proteinu C1q v různých orgánech slávky *M. galloprovincialis* ovšem nezkoumali míru koncentrace IgM. Po vystavení slávky *M. galloprovincialis* PE mikroplastům (1-50 μ m, 460 000 částic/l, 18 dní) byla detekována snížená exprese genů pro různé isoformy komplementového proteinu C1q, a to jak v trávicím systému, tak v plášti mlže (Détrée a Gallardo-Escárate, 2018).

4.3.2 Fagocytóza

Fagocytóza je druh endocytózy prováděný buňkami imunitního systému jako jsou dendritické buňky, makrofágy a neutrofilní granulocyty. Dendritické buňky a makrofágy jsou zároveň antigen prezentující buňky. Neutrofilní granulocyty i makrofágy používají respirační vzplanutí, tedy ROS, na degradaci fagocytované cizorodé částice ve fagozomu. Jak již bylo zmíněno v kapitole o průniku mikroplastů a nanoplastů do buněk organismů, plastové částice jsou schopny se do buněk dostat rozličnými způsoby, mezi které patří i fagocytóza. Bylo prokázáno, že vystavení organismu plastovým částicím ovlivňuje fagocytární aktivitu. Znatelně zvýšenou fagocytární aktivitu zaznamenali Espinosa *et al.* (2017a) u mořana *S. aurata* (PVC, 40-150 μ m, 100 mg/kg krmiva, 15 dní) a o dva roky později také u mořčáka *D. labrax* (PVC, 40-150 μ m, 100 mg/kg krmiva, 21 dní) (Espinosa *et al.*, 2019). V obou studiích byla též zaznamenána vyšší četnost respiračních vzplanutí. U mořčáka *D. labrax* po vystavení PE mikroplastům o velikosti 40-150 μ m při koncentraci 500 mg/kg krmiva došlo k signifikantnímu nárůstu respiračních vzplanutí. U mořana *S. aurata* došlo též k signifikantnímu

zvýšení respiračních vzplanutí za stejných podmínek, kterým byla ryba vystavena 30 dní. Pozoruhodné je, že účinek 40-150 μ m PE nebo PVC mikroplastů při koncentracích 1 mg/ml, 10 mg/ml a 100 mg/ml neměl žádný znatelný vliv na schopnost fagocytózy buněk ryb *S. aurata* a *D. labrax* vystavené těmto podmínkám 1 hodinu a 24 hodin (Espinosa *et al.*, 2018). Výjimkou v této práci je znatelný pokles fagocytární aktivity u mořanů *S. aurata* vystavených PVC částicím po dobu 24 hodin. Toto není jediná zmínka o poklesu fagocytární aktivity po vystavení živočicha plastovým částicím. Bergami *et al.* (2019a) publikovali článek o působení PS-COOH (40 nm) a PS-NH₂ (50 nm) nanoplastů o koncentraci 1 a 5 μ g/ml po dobu 6 a 24 hodin na mořského ježka *S. neumayeri*. Oba typy PS nanoplastů za daných podmínek snižovaly fagocytární aktivitu. Také Canesi *et al.* (2015) v práci popisují sníženou aktivitu fagocytózy u slávky *M. galloprovincialis* vystavené 50nm PS-NH₂ částicím. Největší pokles aktivity zaznamenali při koncentraci 50 μ g/ml po 30 minutách působení. Další studie na slávce *M. galloprovincialis* prokázala nejen sníženou kapacitu fagocytózy za všech daných podmínek (PS, 50 nm, 100 nm, 1 μ m, 1 mg/l, expozice 3 hodiny), ale také změny v konformaci aktinových vláken (Sendra *et al.*, 2020). Pozoruhodná je skutečnost, že i přes sníženou schopnost buněk fagocytovat se zvýšil počet respiračních vzplanutí (Espinosa *et al.*, 2018), koncentrace oxidu dusnatého (NO) (Canesi *et al.*, 2015), či exprese genu pro jednu z isoform NO syntázy (Yang *et al.*, 2020). Respirační vzplanutí a s ním spjaté vyšší koncentrace NO poukazují na možnost vzniku zánětu v těle živočichů v reakci na mikroplasty a nanoplasty.

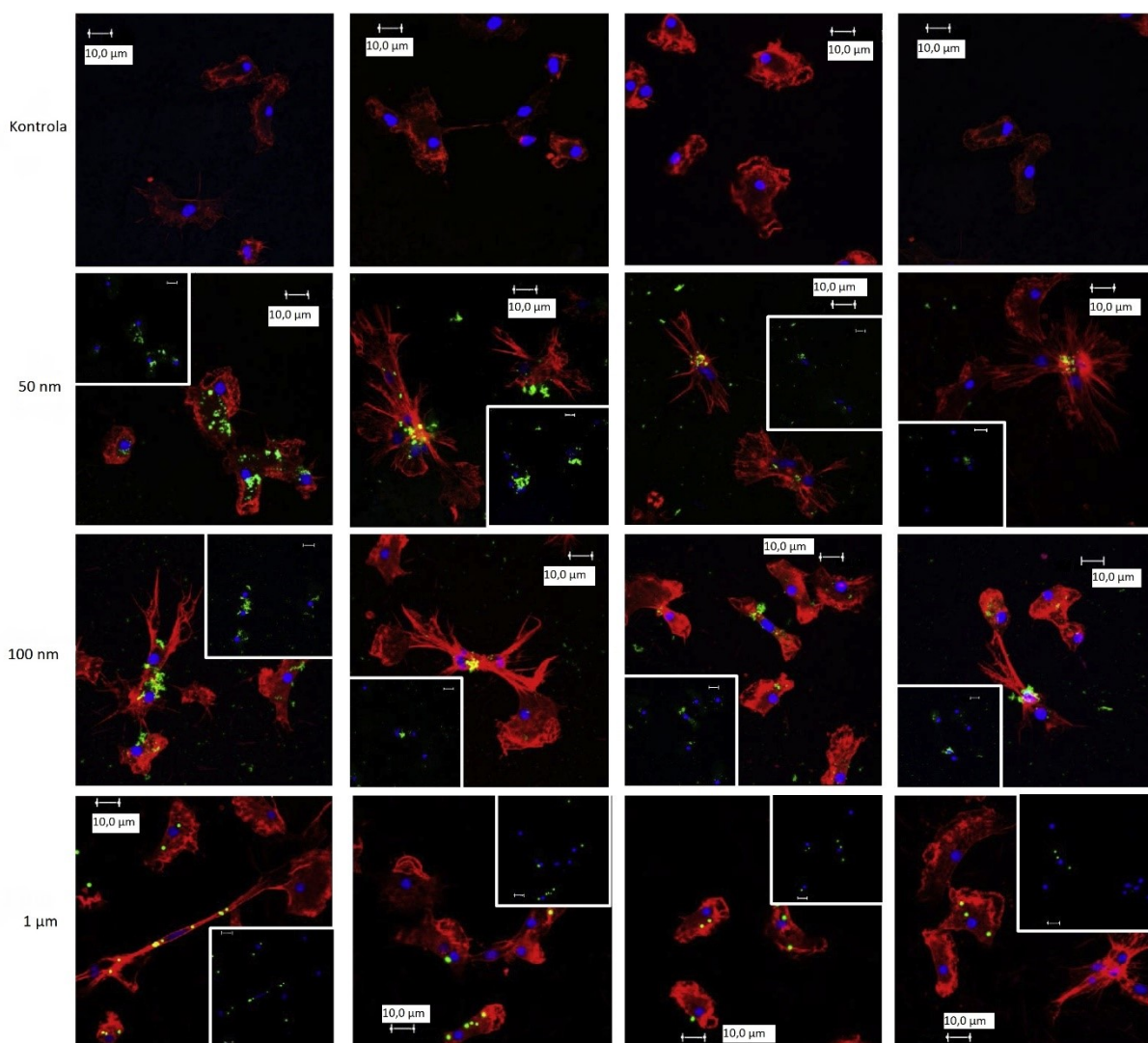
4.3.3 Zánět

Zánět je mechanismus, kterým se tělo živočichů brání proti infekčním mikroorganismům a vnějším chemickým a fyzikálním vlivům. Zánět se zevně projevuje zčervenáním, otokem, bolestivostí a zvýšením teploty v místě zánětu. Na buněčné úrovni se zánět obecně projevuje zvýšeným počtem leukocytů (leukocytóza) způsobených migrací bílých krvinek do místa zánětu. Toto migrování je usnadněno žírnými buňkami, které na základě informace o poškození tkáně či průniku cizorodé částice do organismu vypouštějí histamin fungující jako vazodilatans. Hwang *et al.* (2019) na odvozených lidských buňkách imunitního systému prokázali, že HDPE mikroplasty (20 μ m, 25-200 μ m) při koncentraci 500 μ g/ml ve formě prášku i v roztoku zvyšují koncentraci histaminu.

Leukocytóza byla zaznamenána v žábrách a trávicí soustavě zebřičky *D. rerio* (Limonta *et al.*, 2019), která byla vystavena směsi PS a HDPE mikroplastů (90, 50 a 25 μ m) o koncentraci 100 a 1000 μ g/l po dobu 20 dní. Zvýšení leukocytů ve střevě zaznamenali také Ahrendt *et al.* (2020) po krmení tloušťovky *Girella laevis* částicemi poly(styrene-co-divinylbenzenu) o velikosti 8 μ m a koncentracích 0,001 a 0,1 g částic/0,5 g krmiva po dobu 45 dní. Časným projevem zánětu může být tvorba granulocytomů. Přítomnost granulocytomů tvořených eosinofilními granulocyty zaznamenali již po 3 hodinách Von Moos *et al.* (2012), když vystavili slávku *M. edulis* HDPE mikroplastům (0-80 μ m; 2,5 g prášku částic/l).

Nejen z leukocytózy a tvorby granulocytomů lze usuzovat, že různé druhy plastových částic spouštějí odlišně silnou zánětlivou reakci. Zvýšená exprese genů pro látky účastnící se tvorby zánětu tento fakt potvrzuje (viz Tabulka 2, str. 19).

Dalším ukazatelem tvorby zánětu může být snížená aktivita alkalické fosfatázy (ALP) (Brandts *et al.*, 2018a). ALP je enzym, který mimo jiné defosforuluje cizorodé látky spouštějící zánět a tím brání ve vzniku zánětu. Funguje tedy jako protizánětlivý agens. Sníženou aktivitu ALP zaznamenali Tang *et al.* (2018), kteří vystavili pórovník *P. damicornis* po dobu 6, 12 a 24 hodin 1 μm PS mikroplastům o koncentraci 50 mg/l.



Obrázek 4 Internalizace Fluoresbrite® PS částic do buněk a změny v konformaci aktinu (modrá: DAPI, červená: aktin, zelená: PS plastové částice), snímky byly pořízeny konfokálním mikroskopem. Měřítka: 10 μm (Sendra *et al.*, 2020).

Tabulka 2 Expres genů pro látky účastnící se zánětlivé odpovědi organismu.

Živočich	Typ orgánu	Typ plastu	Velikost	Koncentrace	Čas expozice	Biomarker	Genová exprese	Citace
<i>M. galloprovincialis</i>	žábry			0,05 mg/l; 0,5 mg/l	96 h	<i>lys</i>	—	(Brandts <i>et al.</i> , 2018b)
						<i>clap</i>	↑	
	trávicí soustava	PS	106±10 nm	0,005 mg/l; 0,05 mg/l; 0,5 mg/l; 5 mg/l, 50 mg/l		<i>lys</i>	—	
						<i>clap</i>		
<i>S. neumayeri</i>	coelomycety	PS-COOH	40 nm	1 a 5 µg/ml	6 h, 24 h	<i>AIF-1</i>	—	(Bergami <i>et al.</i> , 2019a)
		PS-NH ₂	50 nm					
<i>D. rerio</i>	střevo	PS	0,5 µm	1000 µg/l	14 dní	<i>il-1β</i>	↑	(Jin <i>et al.</i> , 2018)
						<i>il-1α</i>		
						<i>ifn</i>		
						<i>il-8</i>		
						<i>ifn</i>		
	50 µm				↑			
<i>D. rerio</i> (larva)	—	PS	5 µm	50 ng/ml	7 dní	<i>il-1β</i>	↑	(Yang <i>et al.</i> , 2020)
						<i>il-8</i>		
						<i>tnfα</i>		
						<i>il-10</i>		
						<i>il-12α</i>		
						<i>nf-κb</i>		
<i>D. labrax</i>	játra	PE	40-150 µm	100 mg/kg krmiva	3 týdny	<i>il-1β</i>	↑	(Espinosa <i>et al.</i> , 2019)
						<i>il-8</i>	↑	
						<i>prdx1</i>	↓	
<i>D. labrax</i>	játra	PMMA	45 nm	0,02 mg/l; 0,2 mg/l; 2 mg/l	96 h	<i>il-1β</i>	—	(Brandts <i>et al.</i> , 2018a)
						<i>il-6</i>		
						<i>tnfα</i>		
						<i>il-10</i>		

Lysozym (lys), cathepsin (cat), allograft inflammatory factor 1 (AIF-1), interleukin (il-), interferon (inf), nukleární faktor kappa B (nf-κb), peroxiredoxin 1 (prdx1). Zvýšená exprese genu (↑), snížená exprese genu (↓), žádná významná změna v expresi genu (-).

4.4 Neurotoxicita

Jako neurotoxická se označuje látka, která nepříznivě působí na centrální i periferní (PNS) nervovou soustavu organismů. Způsobuje změny v aktivitách enzymů a koncentracích neurotransmiterů. Tyto změny mohou být spojeny se změnou chování živočicha. Změna chování může mít vliv až na fitness organismu a ovlivnit tak schopnost množit se či přežít (Mattsson *et al.*, 2017). Mikroplasty a nanoplasty se řadí mezi neurotoxikanty chemického původu. Vhodným ukazatelem neurotoxicity je změna aktivity enzymů štěpících neurotransmitery, jako je například acetylcholin esteráza (AChE) (Galgani a Bocquene, 2008), zvýšená či snížená koncentrace nebo aktivita neurotransmiterů, popřípadě změna exprese genů pro receptory neurotransmiterů. U živočichů s jednoduchou nervovou soustavou, bez hematoencefalické bariéry a u PNS vyšších živočichů mají plastové částice možnost se dostat přímo k neuronům.

Velmi zajímavá je otázka, zda mohou mikroplasty a nanoplasty překonat hematoencefalickou bariéru a dostat se tak přímo do mozku. Byly publikovány práce, které přítomnost plastových částic v mozku potvrzují (Kashiwada, 2006; Chen *et al.*, 2017). Bylo prokázáno, že přes hematoencefalickou bariéru dokáží prostoupit jak mikroplasty, tak nanoplasty. Mattsson *et al.* (2017) zaznamenali pomocí hyperspektrální mikroskopie vyšší přítomnost PS nanoplastů než mikroplastů modifikovaných aminoskupinou v mozku karase *Carassius carassius* po 64 dnech při koncentraci plastových částic 100 mg/l. Také zvýšené oxidativní poškození lipidů v mozku dokazuje přítomnost plastových částic v mozkové tkáni (Barboza *et al.*, 2018; Barboza *et al.*, 2020).

4.4.1 Enzymy štěpící neurotransmitery

AChE je enzym, jehož funkcí je štěpit neurotransmiter acetylcholin (ACh) a napomáhat tak k jeho inaktivaci. Zvýšená či snížená aktivita AChE funguje jako detektor neurotoxicity. Jak už bylo mnohokrát řečeno, neexistuje jednotný způsob, kterým by mikroplasty a nanoplasty ovlivňovaly metabolické a signální dráhy, nebo změnu genové exprese. To samé platí i u nervové soustavy živočichů, což dosvědčují protichůdné výsledky prací týkajících se aktivity AChE. Výsledkem sledování aktivity AChE u různých druhů organismů vystavených různým druhům a velikostem plastů v drtivé většině prací byla snížená aktivita (Barboza *et al.*, 2018; Miranda *et al.*, 2019), nebo žádná výrazná změna aktivity AChE (Tang *et al.*, 2020a; Magni *et al.*, 2018). Snížená aktivita či koncentrace AChE se projevovala po vystavení různých druhů organismů PS, PE, PP i PVC částicím za specifických podmínek (Ribeiro *et al.*, 2017; Iheanacho a Odo, 2020; Oliveira *et al.*, 2013; Tlili *et al.*, 2020), (viz Tabulka 3, str. 22).

Dalším enzymem, u kterého může být změna v aktivitě důkazem neurotoxicity je monoamin oxidáza (MAO). Aktivitou MAO dochází k oxidativní deaminaci monoaminových neurotransmiterů, jakými jsou například dopamin (DOP), serotonin (SER) nebo noradrenalin. Tang *et al.* (2020a) v článku popisují sníženou aktivitu MAO po vystavení návykové *T. granosa* PS mikroplastům o velikosti 490 ± 11 nm při koncentraci 1 mg/l po dobu 14 dní. Žádná výrazná změna v aktivitě MAO naopak

nebyla zaznamenána u slávičky *Dreissena polymorpha* vystavené dvěma směsím PS mikroplastů o velikostech 1 a 10 μm v různých poměrech koncentrací po 6 dnech (Magni *et al.*, 2018).

4.4.2 Neurotransmitery

Neurotransmitery jsou látky vznikající v nervovém systému živočichů sloužící k přenosu nervového vzruchu. Disbalance v koncentracích neurotransmiterů může značit neurotoxicitu, nebo možnou snahu organismu vyrovnat se s nepříznivými podmínkami. Zvýšení DOP bylo detekováno po vystavení slávičky *D. polymorpha* směsím PS mikroplastů o velikostech 1 a 10 μm (Magni *et al.*, 2018). Toto zvýšení koncentrace DOP je zde vysvětleno jako možný obranný mechanismus měkkýše. Zvýšená hladina DOP mohla způsobit zvýšený pohyb cílů ve střevě a tím usnadnit eliminaci mikroplastů z orgánové soustavy. Mimo zvýšenou aktivitu DOP nebyla v práci zaznamenána žádná signifikantní změna v koncentraci SER a glutaminu. V jiné studii zabývající se změnou koncentrací dalších typů neurotransmiterů nebyla u návky *T. granosa* zaznamenána výrazná změna v koncentraci kyseliny gama-aminomáselné (GABA) a ACh, zato koncentrace DOP byla zvýšená (Tang *et al.*, 2020a). Náвка *T. granosa* byla vystavena PS mikroplastům o velikosti $490 \pm 11 \text{ nm}$ o koncentraci 1 mg/l po dobu 14 dní. Důvodem zvýšení koncentrace DOP v obou pracích by mohl být shodný výběr druhu plastu a živočicha. V obou případech se jednalo o návky vystavené PS mikroplastům. Po vystavení larvy zebřičky *D. rerio* 50 μm PS mikroplastům o koncentracích 100 a 1000 $\mu\text{g/l}$ po dobu 7 dní byla detekována snížená koncentrace taurinu a zvýšená koncentrace aspartátu (Wan *et al.*, 2019).

4.4.3 Genová exprese

U larvy zebřičky *D. rerio* byla zaznamenána snížená exprese genů pro glutamátové receptory, draslíkové kanály 3 a 6, nespecifické transportéry a synapsin. Dále byla zaznamenána snížená exprese genů pro diferenciaci a růst neuronů *neurod4* a *lrnn2*. Larva byla vystavena PE mikroplastům o velikosti od 10 μm do 45 μm a koncentraci 5 mg/l po dobu 2 a 14 dní (LeMoine *et al.*, 2018). Po vystavení návky *T. granosa* 490nm PS mikroplastům o koncentraci 1 mg/l po dobu 14 dní byla detekována snížená genová exprese pro receptory neurotransmiterů GABA a DOP (Tang *et al.*, 2020a).

Tabulka 3 Aktivita AChE po vystavení různých druhů živočichů plastovým částicím.

Živočich	Typ orgánu	Typ plastu	Velikost	Koncentrace	Čas expozice	Biomarker	Projev ovlivnění	Citace
<i>D. rerio</i>	mozek	PS	70 nm	0,5 mg/l; 1,5 mg/l	7 dní	AChE	snížená koncentrace	(Sarasamma <i>et al.</i> , 2020)
<i>S. plana</i>	žábry	PS	20 µm	1 mg/l	14 dní	AChE	snížená aktivita	(Ribeiro <i>et al.</i> , 2017)
<i>Clarias gariepinus</i>	žábry, mozek	PVC	95,41 ± 4,23 µm	0,50 %; 1,50 %; 3,0 %	45 dní	AChE	snížená aktivita	(Iheanacho a Odo, 2020)
<i>Pomatoschistus microps</i>	mozek	PE	1-5 µm	18,4 µg/l; 184 µg/l	96 h	AChE	snížená aktivita	(Oliveira <i>et al.</i> , 2013)
<i>P. microps</i>	–	PE	1-5 µm	0,14 mg/l	96 h	AChE	snížená aktivita	(Miranda <i>et al.</i> , 2019)
<i>Donax trunculus</i>	žábry	PE/PP mix	100-400 µm	0,06 g (PE/PP) /1 kg písku	3 h, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15 dní	AChE	snížená aktivita	(Tlili <i>et al.</i> , 2020)
<i>D. labrax</i>	mozek	–	1-5 µm	0,26 mg/l; 0,69 mg/l	96 h	AChE	snížená aktivita	(Barboza <i>et al.</i> , 2018)
<i>D. polymorpha</i>	střevo	PS	1 µm, 10 µm	50 mg/l	6 dní	AChE	žádná signifikantní aktivita	(Magni <i>et al.</i> , 2018)
<i>T. granosa</i>	–	PS	490 ± 11 nm	1 mg/l	14 dní	AChE	žádná signifikantní aktivita	(Tang <i>et al.</i> , 2020a)

5. Závěr

Mikroplasty a nanoplasty představují nový typ znečištění životního prostředí. Publikované informace o jejich působení na organismy ukazují možná rizika, nicméně účinky na organismy na molekulární úrovni jsou prozatím neúplné.

Ohledně průniku mikroplastů a nanoplastů do buněk organismů je známo, že dokáží do buněk procházet endocytózou. Zda dokáží volně membránami procházet nanoplasty, které se velikostně pohybují na hranici 0,1 μm a mikroplasty dosud známo není. Další působení mikroplastů a nanoplastů na buněčné orgány a funkci buňky jako takové, jak naznačují některé publikace, by mohlo být spojeno právě se způsobem, jakým se do buňky částice dostávají. Stejně tak mechanismus vzniku ROS prozatím nebyl objasněn. Zda dochází dříve ke zvýšení koncentrace ROS nebo ke snížení membránového potenciálu mitochondrií. Vzhledem k potenciální schopnosti plastových částic procházet přes cytoplasmatické membrány buněk bez využití endocytických mechanismů, by zde byla možnost přímého narušení mitochondriální membrány dané buňky plastovými částicemi, tudíž její depolarizace a zvýšená produkce ROS. Zvýšená koncentrace ROS pak může aktivovat další obranné mechanismy buňky.

Jako indikátor oxidativního stresu byla například pozorována zvýšená exprese genů pro proteiny HSP u organismů vystavených mikroplastům a nanoplastům. Příčinou této zvýšené exprese genů mohla být nestabilita proteinů vyvolaná právě zvýšenou koncentrací ROS v buňce. Proč, jakým mechanismem a za jakých podmínek dochází ke snížené expresi genů pro HSP není prozatím objasněno. Teoreticky by mohlo za určitých podmínek dojít až k takovému poškození buňky, které by zasáhlo signální a transkripční dráhu pro tvorbu proteinů HSP. Taková buňka by pak mohla zahájit apoptózu.

Genotoxicita je v této oblasti okrajově zkoumaným tématem. Existuje řada výzkumů, které potvrzují výskyt genotoxicity po styku organismu s mikroplasty či nanoplasty. Z výzkumů dále vychází, že nejen ROS, ale samotné částice plastů by mohly přímo reagovat s DNA a tím molekulu poškodit. Jakým mechanismem a za jakých podmínek by mohlo docházet k reakci nanoplastů nebo mikroplastů s DNA není zatím známo. Další otázkou je, zda by mikroplasty a nanoplasty, které se velikostně pohybují na hranici 0,1 μm mohly projít přes jadernou membránu a působit na DNA.

Působení plastových částic na imunitní systém také není dostatečně prozkoumáno. Například mechanismy, kterými mikroplasty snižují expresi TLR nejsou známy. Rovněž není objasněno, jestli se mikroplasty a nanoplasty mohou vázat na TLR nebo CLR a spouštět tak prozánětlivou odpověď. Ve výše popsaných studiích se nezmiňuje, zda mohlo dojít po vstupu částic do organismu k adsorpci biopolymerů na povrch mikroplastů. Potřebná by tedy byla *in vitro* studie kontaktu mezi nemodifikovanými čistými mikroplasty a PRRs imunitních buněk. Také není objasněno, zda se IgM dokáží vázat na mikroplasty a nanoplasty a za jakých podmínek se tak stává. Dosavadní informace o ovlivnění IgM a částí komplementu jsou spíše útržkovité. Jakým mechanismem dochází ke zvýšené či snížené schopnosti fagocytózy také není jasné. Mohla by ovšem existovat spojitost mezi detekovanou

změnou konformace aktinových vláken důležitých při tvorbě fagozomu a sníženou schopností fagocytózy.

Mechanismus, jakým mikroplasty a nanoplasty působí na nervovou soustavu a zapříčiňují změny v aktivitě a koncentraci neurotransmiterů, enzymů odbourávajících neurotransmitery či jak působí na změnu genové exprese, rovněž není znám.

Nutno zdůraznit, že všechny pokusy byly prováděny v laboratorním prostředí. Tudíž koncentrace mikroplastů a nanoplastů, kterým byly organismy vystaveny, často nemusely odpovídat koncentracím částic v přírodě. Také je málo pravděpodobné, že by byly volně žijící organismy vystaveny čistým plastovým částicím jen jednoho druhu, velikosti a tvaru. Není tedy jasné, že se všechny dosud sledované příčiny působení plastových částic projevují i u volně žijících organismů. Na druhou stranu výzkumy z reálného prostředí se v dnešní době nejspíše budou potýkat s problémem kontrolních organismů, nevystavených plastovým částicím. Z publikací výše popsaných obecně vyplývá, že působení částic se odvíjí od typu a velikosti plastu. Také závisí na čase, druhu živočicha a orgánové soustavě daného organismu. Není ovšem nikde zmíněno, jestli po vstupu plastové částice do organismu dochází k adsorpci biopolymerů na její povrch. Pokud by docházelo k adsorpci, bylo by vhodné zjistit na jaký typ plastu se váží jaké biopolymery. Osvětlení tématu adsorpce biopolymerů na povrch plastových částic by mohlo mít vliv na vysvětlení některých molekulárních mechanismů působení mikroplastů a nanoplastů.

Z uvedených informací a souvislostí vyplývá, že ačkoliv je téma molekulárního působení mikroplastů a nanoplastů intenzivně zkoumané, existuje řada neosvětlených molekulárních mechanismů a je tedy potřeba dalších výzkumů.

Bibliografie

Reviews označena na konci citace – **review**.

AHRENDT, C., D.J. PEREZ-VENEGAS, M. URBINA, C. GONZALEZ, P. ECHEVESTE, M. ALDANA, J. PULGAR a C. GALBÁN-MALAGÓN, 2020. Microplastic ingestion cause intestinal lesions in the intertidal fish *Girella laevis*. *Marine Pollution Bulletin* [online]. **151** [cit. 2020-07-25]. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2019.110795. ISSN 0025326X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025326X19309518>

AL-SID-CHEIKH, Maya, Steve J. ROWLAND, Karen STEVENSON, Claude ROULEAU, Theodore B. HENRY a Richard C. THOMPSON, 2018. Uptake, Whole-Body Distribution, and Depuration of Nanoplastics by the Scallop *Pecten maximus* at Environmentally Realistic Concentrations. *Environmental Science & Technology* [online]. **52**(24), 14480-14486 [cit. 2020-07-02]. DOI: 10.1021/acs.est.8b05266. ISSN 0013-936X. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.8b05266>

ASHBY, J., H. TINWELL, P.A. LEFEVRE a M.A. BROWNE, 1995. The single cell gel electrophoresis assay for induced DNA damage (comet assay): measurement of tail length and moment. *Mutagenesis* [online]. **10**(2), 85-90 [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.1093/mutage/10.2.85. ISSN 0267-8357. Dostupné z: <https://academic.oup.com/mutage/article-lookup/doi/10.1093/mutage/10.2.85>

AVIO, Carlo Giacomo, Stefania GORBI, Massimo MILAN et al., 2015. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environmental Pollution* [online]. **198**, 211-222 [cit. 2020-07-13]. DOI: 10.1016/j.envpol.2014.12.021. ISSN 02697491. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749114005211>

BARBOZA, Luís, Clara LOPES, Patrícia OLIVEIRA et al., 2020. Microplastics in wild fish from North East Atlantic Ocean and its potential for causing neurotoxic effects, lipid oxidative damage, and human health risks associated with ingestion exposure. *Science of The Total Environment* [online]. **717** [cit. 2020-07-14]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134625. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969719346169>

BARBOZA, Luís, Luís VIEIRA, Vasco BRANCO, Neusa FIGUEIREDO, Felix CARVALHO, Cristina CARVALHO a Lúcia GUILHERMINO, 2018. Microplastics cause neurotoxicity, oxidative damage and energy-related changes and interact with the bioaccumulation of mercury in the European seabass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquatic Toxicology* [online]. **195**, 49-57 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.aquatox.2017.12.008. ISSN 0166445X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X17303776>

BERGAMI, E., A. KRUPINSKI EMERENCIANO, M. GONZÁLEZ-ARAVENA, C. CÁRDENAS, P. HERNÁNDEZ, J. SILVA a I. CORSI, 2019c. Polystyrene nanoparticles affect the innate immune system of the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*. *Polar Biology* [online]. **42**(4), 743-757 [cit. 2020-08-05]. DOI: 10.1007/s00300-019-02468-6. ISSN 07224060.

BERGAMI, E., A. KRUPINSKI EMERENCIANO, M. GONZÁLEZ-ARAVENA, C. CÁRDENAS, P. HERNÁNDEZ, J. SILVA a I. CORSI, 2019a. Polystyrene nanoparticles affect the innate immune system of the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*. *Polar Biology* [online]. **42**(4), 743-757 [cit. 2020-07-21]. DOI: 10.1007/s00300-019-02468-6. ISSN 0722-4060. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00300-019-02468-6>

BERGAMI, E., A. KRUPINSKI EMERENCIANO, M. GONZÁLEZ-ARAVENA, C. CÁRDENAS, P. HERNÁNDEZ, J. SILVA a I. CORSI, 2019b. Polystyrene nanoparticles affect the innate immune system of the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*. *Polar Biology* [online]. **42**(4), 743-757 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1007/s00300-019-02468-6. ISSN 0722-4060. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00300-019-02468-6>

BERGAMI, E., S. PUGNALINI, M.L. VANNUCCINI, L. MANFRA, C. FALERI, F. SAVORELLI, K.A. DAWSON a I. CORSI, 2017. Long-term toxicity of surface-charged polystyrene nanoplastics to marine planktonic species *Dunaliella tertiolecta* and *Artemia franciscana*. *Aquatic Toxicology* [online]. **189**, 159-169 [cit. 2020-07-07]. DOI: 10.1016/j.aquatox.2017.06.008. ISSN 0166445X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X17301625>

BEXIGA, Mariana, Juan VARELA, Fengjuan WANG, Federico FENAROLI, Anna SALVATI, Iseult LYNCH, Jeremy SIMPSON a Kenneth DAWSON, 2010. Cationic nanoparticles induce caspase 3-, 7- and 9-mediated cytotoxicity in a human astrocytoma cell line. *Nanotoxicology* [online]. **5**(4), 557-567 [cit. 2020-08-05]. DOI: 10.3109/17435390.2010.539713. ISSN 1743-5390. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/17435390.2010.539713>

BOUSSIF, O., F. LEZOUALC'H, M. ZANTA, M. MERGNY, D. SCHERMAN, B. DEMENEIX a J. BEHR, 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **92**(16), 7297-7301 [cit. 2020-08-07]. DOI: 10.1073/pnas.92.16.7297. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.92.16.7297>

BOYA, P a G KROEMER, 2008. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* [online]. **27**(50), 6434-6451 [cit. 2020-08-06]. DOI: 10.1038/onc.2008.310. ISSN 0950-9232. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/onc2008310> - review

BRANDTS, I., M. TELES, A.P. GONÇALVES et al., 2018b. Effects of nanoplastics on *Mytilus galloprovincialis* after individual and combined exposure with carbamazepine. *Science of The Total Environment* [online]. **643**, 775-784 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.257. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969718323337>

BRANDTS, I., M. TELES, A. TVARIJONAVICIUTE, M.L. PEREIRA, M.A. MARTINS, L. TORT a M. OLIVEIRA, 2018a. Effects of polymethylmethacrylate nanoplastics on *Dicentrarchus labrax*. *Genomics* [online]. **110**(6), 435-441 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.ygeno.2018.10.006. ISSN 08887543. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0888754318303653>

BURTON, Graham J. a Eric JAUNIAUX, 2011. Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* [online]. **25**(3), 287-299 [cit. 2020-07-07]. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016. ISSN 15216934. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521693410001392> - review

CAMPISI J, Leem TH, Fleshner M., 2003. Stress-induced extracellular Hsp72 is a functionally significant danger signal to the immune system. *Cell Stress Chaperones*; **8**(3):272-286. doi:10.1379/1466-1268(2003)008<0272:sehiaf>2.0.co;2

CANESI, L., C. CIACCI, E. BERGAMI, M.P. MONOPOLI, K.A. DAWSON, S. PAPA, B. CANONICO a I. CORSI, 2015. Evidence for immunomodulation and apoptotic processes induced by cationic polystyrene nanoparticles in the hemocytes of the marine bivalve *Mytilus*. *Marine Environmental Research* [online]. **111**, 34-

40 [cit. 2020-07-03]. DOI: 10.1016/j.marenvres.2015.06.008. ISSN 01411136. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014111361500094X>

CORTÉS, Constanza, Josefa DOMENECH, Marcela SALAZAR, Susana PASTOR, Ricard MARCOS a Alba HERNÁNDEZ, 2020. Nanoplastics as a potential environmental health factor: effects of polystyrene nanoparticles on human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Environmental Science: Nano* [online]. 7(1), 272-285 [cit. 2020-07-13]. DOI: 10.1039/C9EN00523D. ISSN 2051-8153. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C9EN00523D>

DELLA TORRE, C., E. BERGAMI, A. SALVATI, C. FALERI, P. CIRINO, K. DAWSON a I. CORSI, 2014. Accumulation and Embryotoxicity of Polystyrene Nanoparticles at Early Stage of Development of Sea Urchin Embryos *Paracentrotus lividus*. *Environmental Science & Technology* [online]. 48(20), 12302-12311 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1021/es502569w. ISSN 0013-936X. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es502569w>

DESFORGES, Jean-Pierre W., Moira GALBRAITH, Neil DANGERFIELD a Peter S. ROSS, 2014. Widespread distribution of microplastics in subsurface seawater in the NE Pacific Ocean. *Marine Pollution Bulletin* [online]. 79(1-2), 94-99 [cit. 2020-07-01]. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2013.12.035. ISSN 0025326X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025326X13007741>

DÉTRÉE, Camille a Cristian GALLARDO-ESCÁRATE, 2018. Single and repetitive microplastics exposures induce immune system modulation and homeostasis alteration in the edible mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Fish & Shellfish Immunology* [online]. 83, 52-60 [cit. 2020-07-21]. DOI: 10.1016/j.fsi.2018.09.018. ISSN 10504648. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050464818305540>

DING, Jiannan, Shanshan ZHANG, Roger Mamitiana RAZANAJATOVO, Hua ZOU a Wenbin ZHU, 2018. Accumulation, tissue distribution, and biochemical effects of polystyrene microplastics in the freshwater fish red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Pollution* [online]. 238, 1-9 [cit. 2020-07-10]. DOI: 10.1016/j.envpol.2018.03.001. ISSN 02697491. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749117342355>

DRIS, Rachid, Johnny GASPERI, Mohamed SAAD, Cécile MIRANDE a Bruno TASSIN, 2016. Synthetic fibers in atmospheric fallout: A source of microplastics in the environment?. *Marine Pollution Bulletin* [online]. 104(1-2), 290-293 [cit. 2020-07-02]. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2016.01.006. ISSN 0025326X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025326X16300066>

ELMORE, Susan, 2016. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* [online]. 35(4), 495-516 [cit. 2020-08-11]. DOI: 10.1080/01926230701320337. ISSN 0192-6233. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1080/01926230701320337> - review

EOM, Hye-Jin, Sang-Eun NAM a Jae-Sung RHEE, 2020. Polystyrene microplastics induce mortality through acute cell stress and inhibition of cholinergic activity in a brine shrimp. *Molecular & Cellular Toxicology* [online]. 16(3), 233-243 [cit. 2020-07-30]. DOI: 10.1007/s13273-020-00088-4. ISSN 1738-642X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13273-020-00088-4>

ESPINOSA, Cristóbal, Alberto CUESTA a María ESTEBAN, 2017a. Effects of dietary polyvinylchloride microparticles on general health, immune status and expression of several genes related to stress in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology* [online]. 68, 251-259 [cit. 2020-03-23]. DOI:

10.1016/j.fsi.2017.07.006. ISSN 10504648. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S105046481730390X>

ESPINOSA, Cristóbal, Alberto CUESTA a María ESTEBAN, 2017b. Effects of dietary polyvinylchloride microparticles on general health, immune status and expression of several genes related to stress in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology* [online]. **68**, 251-259 [cit. 2020-07-21]. DOI: 10.1016/j.fsi.2017.07.006. ISSN 10504648. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S105046481730390X>

ESPINOSA, Cristóbal, María ESTEBAN a Alberto CUESTA, 2019. Dietary administration of PVC and PE microplastics produces histological damage, oxidative stress and immunoregulation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Fish & Shellfish Immunology* [online]. **95**, 574-583 [cit. 2020-07-14]. DOI: 10.1016/j.fsi.2019.10.072. ISSN 10504648. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S105046481931040X>

ESPINOSA, Cristóbal, José GARCÍA BELTRÁN, María ESTEBAN a Alberto CUESTA, 2018. In vitro effects of virgin microplastics on fish head-kidney leucocyte activities. *Environmental Pollution* [online]. **235**, 30-38 [cit. 2020-07-21]. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.12.054. ISSN 02697491. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749117331317>

FENDALL, Lisa S. a Mary A. SEWELL, 2009. Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers. *Marine Pollution Bulletin* [online]. **58**(8), 1225-1228 [cit. 2020-07-02]. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2009.04.025. ISSN 0025326X. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025326X09001799>

FENECH, Michael, 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* [online]. **2**(5), 1084-1104 [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.1038/nprot.2007.77. ISSN 1754-2189. Dostupné z:
<http://www.nature.com/articles/nprot.2007.77> - **review**

GALGANI, François a Gilles BOCQUENE, 2008. A method for routine detection of organophosphates and carbamates in sea water. *Environmental Technology Letters* [online]. **10**(3), 311-322 [cit. 2020-07-16]. DOI: 10.1080/09593338909384746. ISSN 0143-2060. Dostupné z:
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09593338909384746>

GAO, Fenglei, Jingxi LI, Chengjun SUN, Letian ZHANG, Fenghua JIANG, Wei CAO a Li ZHENG, 2019. Study on the capability and characteristics of heavy metals enriched on microplastics in marine environment. *Marine Pollution Bulletin* [online]. **144**, 61-67 [cit. 2020-07-04]. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2019.04.039. ISSN 0025326X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025326X19303005>

GARDON, Tony, Lucie MORVAN, Arnaud HUVET, Virgile QUILLIEN, Claude SOYEZ, Gilles LE MOULLAC a Jérémy LE LUYER, 2020. Microplastics induce dose-specific transcriptomic disruptions in energy metabolism and immunity of the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Environmental Pollution* [online]. **266** [cit. 2020-07-21]. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.115180. ISSN 02697491. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749120330190>

GOMES, Tânia, Ana Catarina ALMEIDA a Anastasia GEORGANTZOPOULOU, 2020. Characterization of cell responses in *Rhodomonas baltica* exposed to PMMA nanoplastics. *Science of The Total Environment* [online]. **726** [cit. 2020-07-07]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.138547. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969720320635>

HAMED, Mohamed, Hamdy A. M. SOLIMAN, Alaa G. M. OSMAN a Alaa El-Din H. SAYED, 2020. Antioxidants and molecular damage in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) after exposure to microplastics. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. **27**(13), 14581-14588 [cit. 2020-07-10]. DOI: 10.1007/s11356-020-07898-y. ISSN 0944-1344. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-020-07898-y>

HAN, Jeonghoon, Jun Chul PARK, Hye-Min KANG et al., 2019. Adverse effects, expression of defense-related genes, and oxidative stress-induced MAPK pathway in the benzo[α]pyrene-exposed rotifer *Brachionus rotundiformis*. *Aquatic Toxicology* [online]. **210**, 188-195 [cit. 2020-08-11]. DOI: 10.1016/j.aquatox.2019.03.004. ISSN 0166445X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X19300980>

HU, Lingling, Lei SU, Yingang XUE, Jingli MU, Jingmin ZHU, Jiang XU a Huahong SHI, 2016. Uptake, accumulation and elimination of polystyrene microspheres in tadpoles of *Xenopus tropicalis*. *Chemosphere* [online]. **164**, 611-617 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.09.002. ISSN 00456535. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653516311924>

HWANG, Jangsun, Daheui CHOI, Seora HAN, Jonghoon CHOI a Jinkee HONG, 2019. An assessment of the toxicity of polypropylene microplastics in human derived cells. *Science of The Total Environment* [online]. **684**, 657-669 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.05.071. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969719320832>

CHEN, Qiqing, Daqiang YIN, Yunlu JIA, Sabrina SCHIWY, Jessica LEGRADI, Shouye YANG a Henner HOLLERT, 2017. Enhanced uptake of BPA in the presence of nanoplastics can lead to neurotoxic effects in adult zebrafish. *Science of The Total Environment* [online]. **609**, 1312-1321 [cit. 2020-07-16]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.07.144. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969717318454>

CHOI, Jin Soo, Sang Hee HONG a June-Woo PARK, 2020. Evaluation of microplastic toxicity in accordance with different sizes and exposure times in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Marine Environmental Research* [online]. **153** [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.marenvres.2019.104838. ISSN 01411136. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141113619303927>

IHEANACHO, Stanley a Gregory ODO, 2020. Neurotoxicity, oxidative stress biomarkers and haematological responses in African catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to polyvinyl chloride microparticles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* [online]. **232** [cit. 2020-07-14]. DOI: 10.1016/j.cbpc.2020.108741. ISSN 15320456. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1532045620300417>

IMHOF, Hannes, Jakub RUSEK, Michaela THIEL, Justyna WOLINSKA, Christian LAFORSCH a Jiang-Shiou HWANG, 2017. Do microplastic particles affect *Daphnia magna* at the morphological, life history and molecular level?. *PLOS ONE* [online]. **12**(11) [cit. 2020-06-24]. DOI: 10.1371/journal.pone.0187590. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0187590>

IWALAYE, Oladimeji Ayo, Ganas Kandasamy MOODLEY a Deborah Vivienne ROBERTSON-ANDERSSON, 2020. The possible routes of microplastics uptake in sea cucumber *Holothuria cinerascens* (Brandt, 1835). *Environmental Pollution* [online]. **264** [cit. 2020-07-02]. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.114644. ISSN 02697491. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749120306242>

JEONG, Chang-Bum, Hye-Min KANG, Min-Chul LEE et al., 2017. Adverse effects of microplastics and oxidative stress-induced MAPK/Nrf2 pathway-mediated defense mechanisms in the marine copepod *Paracyclops nana*. *Scientific Reports* [online]. **7**(1) [cit. 2020-06-24]. DOI: 10.1038/srep41323. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/srep41323>

JEONG, Chang-Bum, Eun-Ji WON, Hye-Min KANG et al., 2016. Microplastic Size-Dependent Toxicity, Oxidative Stress Induction, and p-JNK and p-p38 Activation in the Monogonont Rotifer (*Brachionus koreanus*). *Environmental Science & Technology* [online]. **50**(16), 8849-8857 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1021/acs.est.6b01441. ISSN 0013-936X. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.6b01441>

JIANG, Xiaofeng, Ye-qian CHANG, Tong ZHANG, Yu QIAO, Göran KLOBUČAR a Mei LI, 2020. Toxicological effects of polystyrene microplastics on earthworm (*Eisenia fetida*). *Environmental Pollution* [online]. **259** [cit. 2020-07-13]. DOI: 10.1016/j.envpol.2019.113896. ISSN 02697491. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749119344343>

JIANG, Xiaofeng, Hao CHEN, Yuanchen LIAO, Ziqi YE, Mei LI a Göran KLOBUČAR, 2019. Ecotoxicity and genotoxicity of polystyrene microplastics on higher plant *Vicia faba*. *Environmental Pollution* [online]. **250**, 831-838 [cit. 2020-07-13]. DOI: 10.1016/j.envpol.2019.04.055. ISSN 02697491. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749119303574>

JIN, Yuanxiang, Jizhou XIA, Zihong PAN, Jiajing YANG, Wenchao WANG a Zhengwei FU, 2018. Polystyrene microplastics induce microbiota dysbiosis and inflammation in the gut of adult zebrafish. *Environmental Pollution* [online]. **235**, 322-329 [cit. 2020-06-24]. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.12.088. ISSN 02697491. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749117315464>

KASHIWADA, Shosaku, 2006. Distribution of Nanoparticles in the See-through Medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Health Perspectives* [online]. **114**(11), 1697-1702 [cit. 2020-07-16]. DOI: 10.1289/ehp.9209. ISSN 0091-6765. Dostupné z: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.9209>

KIM, Bo-Mi, Jae-Sung RHEE, Chang-Bum JEONG, Jung SEO, Gyung PARK, Young-Mi LEE a Jae-Seong LEE, 2014. Heavy metals induce oxidative stress and trigger oxidative stress-mediated heat shock protein (hsp) modulation in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* [online]. **166**, 65-74 [cit. 2020-07-30]. DOI: 10.1016/j.cbpc.2014.07.005. ISSN 15320456. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S153204561400091X>

KNIGHT, Lydia J., Florence N. F. PARKER-JURD, Maya AL-SID-CHEIKH a Richard C. THOMPSON, 2020. Tyre wear particles: an abundant yet widely unreported microplastic?. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. **27**(15), 18345-18354 [cit. 2020-07-02]. DOI: 10.1007/s11356-020-08187-4. ISSN 0944-1344. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-020-08187-4>

LAMBERT, Scott a Martin WAGNER, 2016. Characterisation of nanoplastics during the degradation of polystyrene. *Chemosphere* [online]. **145**, 265-268 [cit. 2020-07-04]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.11.078. ISSN 00456535. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653515304094>

LEMOINE, Christophe, Bailey KELLEHER, Raphaël LAGARDE, Caleb NORTHAM, Oluwadara ELEBUTE a Bryan CASSONE, 2018. Transcriptional effects of polyethylene microplastics ingestion in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Pollution* [online]. **243**, 591-600 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.envpol.2018.08.084. ISSN 02697491. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749118312910>

LIMONTA, Giacomo, Annalaura MANCIA, Assja BENKHALQUI, Cristiano BERTOLUCCI, Luigi ABELLI, Maria FOSSI a Cristina PANTI, 2019. Microplastics induce transcriptional changes, immune response and behavioral alterations in adult zebrafish. *Scientific Reports* [online]. **9**(1) [cit. 2020-07-14]. DOI: 10.1038/s41598-019-52292-5. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-52292-5>

LIU, Yinghan, Se WANG, Zhuang WANG, Nan YE, Hao FANG a Degao WANG, 2018. TiO₂, SiO₂ and ZrO₂ Nanoparticles Synergistically Provoke Cellular Oxidative Damage in Freshwater Microalgae. *Nanomaterials* [online]. **8**(2) [cit. 2020-07-07]. DOI: 10.3390/nano8020095. ISSN 2079-4991. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2079-4991/8/2/95>

LIU, Zhiquan, Mingqi CAI, Ping YU, Minghai CHEN, Donglei WU, Meng ZHANG a Yunlong ZHAO, 2018. Age-dependent survival, stress defense, and AMPK in *Daphnia pulex* after short-term exposure to a polystyrene nanoplastic. *Aquatic Toxicology* [online]. **204**, 1-8 [cit. 2020-07-30]. DOI: 10.1016/j.aquatox.2018.08.017. ISSN 0166445X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X18305186>

LIU, Zhiquan, Ping YU, Mingqi CAI, Donglei WU, Meng ZHANG, Youhui HUANG a Yunlong ZHAO, 2019. Polystyrene nanoplastic exposure induces immobilization, reproduction, and stress defense in the freshwater cladoceran *Daphnia pulex*. *Chemosphere* [online]. **215**, 74-81 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.09.176. ISSN 00456535. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653518318423>

LI, Zekang, Shuxiang ZHU, Qian LIU, Jialiu WEI, Yinchuan JIN, Xifeng WANG a Lianshuang ZHANG, 2020. Polystyrene microplastics cause cardiac fibrosis by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway and promoting cardiomyocyte apoptosis in rats. *Environmental Pollution* [online]. **265**() [cit. 2020-08-05]. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.115025. ISSN 02697491.

LU, Yifeng, Yan ZHANG, Yongfeng DENG, Wei JIANG, Yanping ZHAO, Jinju GENG, Lili DING a Hongqiang REN, 2016. Uptake and Accumulation of Polystyrene Microplastics in Zebrafish (*Danio rerio*) and Toxic Effects in Liver. *Environmental Science & Technology* [online]. **50**(7), 4054-4060 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1021/acs.est.6b00183. ISSN 0013-936X. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.6b00183>

MAGNI, Stefano, François GAGNÉ, Chantale ANDRÉ et al., 2018. Evaluation of uptake and chronic toxicity of virgin polystyrene microbeads in freshwater zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Mollusca: Bivalvia). *Science of The Total Environment* [online]. **631-632**, 778-788 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.03.075. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969718308295>

MAILHOT, B., S. MORLAT a J.-L. GARDETTE, 2000. Photooxidation of blends of polystyrene and poly(vinyl methyl ether): FTIR and AFM studies. *Polymer* [online]. **41**(6), 1981-1988 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/S0032-3861(99)00204-9. ISSN 00323861. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386199002049>

MAK, Chu Wa, Kirsten CHING-FONG YEUNG a King Ming CHAN, 2019. Acute toxic effects of polyethylene microplastic on adult zebrafish. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. **182** [cit. 2020-07-10]. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.109442. ISSN 01476513. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651319307730>

MARSHALL, Jean S., Richard WARRINGTON, Wade WATSON a Harold L. KIM, 2018. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* [online]. **14**(2) [cit. 2020-08-11]. DOI: 10.1186/s13223-018-0278-1. ISSN 1710-1492. Dostupné z: <https://aacijournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13223-018-0278-1>

MATTSSON, Karin, Elyse JOHNSON, Anders MALMENDAL, Sara LINSE, Lars-Anders HANSSON a Tommy CEDERVALL, 2017. Brain damage and behavioural disorders in fish induced by plastic nanoparticles delivered through the food chain. *Scientific Reports* [online]. **7**(1) [cit. 2020-07-16]. DOI: 10.1038/s41598-017-10813-0. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-10813-0>

MAZURAS, D., B. ERNANDE, P. QUAZUGUEL et al., 2015. Evaluation of the impact of polyethylene microbeads ingestion in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Marine Environmental Research* [online]. **112**, 78-85 [cit. 2020-07-10]. DOI: 10.1016/j.marenvres.2015.09.009. ISSN 01411136. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141113615300489>

MESSINETTI, S., S. MERCURIO, G. SCARÌ, A. PENNATI a R. PENNATI, 2019. Ingested microscopic plastics translocate from the gut cavity of juveniles of the ascidian *Ciona intestinalis*. *The European Zoological Journal* [online]. **86**(1), 189-195 [cit. 2020-07-03]. DOI: 10.1080/24750263.2019.1616837. ISSN 2475-0263. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/24750263.2019.1616837>

MIRANDA, Tiago, Luis VIEIRA a Lúcia GUILHERMINO, 2019. Neurotoxicity, Behavior, and Lethal Effects of Cadmium, Microplastics, and Their Mixtures on *Pomatoschistus microps* Juveniles from Two Wild Populations Exposed under Laboratory Conditions—Implications to Environmental and Human Risk Assessment. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. **16**(16) [cit. 2020-07-14]. DOI: 10.3390/ijerph16162857. ISSN 1660-4601. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1660-4601/16/16/2857>

MOUNTFORD, A. S. a M. A. MORALES MAQUEDA, 2019. Eulerian Modeling of the Three-Dimensional Distribution of Seven Popular Microplastic Types in the Global Ocean. *Journal of Geophysical Research: Oceans* [online]. **124**(12), 8558-8573 [cit. 2020-07-02]. DOI: 10.1029/2019JC015050. ISSN 2169-9275. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1029/2019JC015050>

NAPPER, Imogen E. a Richard C. THOMPSON, 2016. Release of synthetic microplastic plastic fibres from domestic washing machines: Effects of fabric type and washing conditions. *Marine Pollution Bulletin* [online]. **112**(1-2), 39-45 [cit. 2020-07-02]. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2016.09.025. ISSN 0025326X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025326X16307639>

NIZZETTO, Luca, Gianbattista BUSSI, Martyn N. FUTTER, Dan BUTTERFIELD a Paul G. WHITEHEAD, 2016. A theoretical assessment of microplastic transport in river catchments and their retention by soils and river sediments. *Environmental Science: Processes & Impacts* [online]. **18**(8), 1050-1059 [cit. 2020-07-04]. DOI: 10.1039/C6EM00206D. ISSN 2050-7887. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6EM00206D>

(NOAA, 2008) C. Arthur, J.E. Baker, H.A. Bamford, Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects, and Fate of Microplastic Marine Debris, 9-11 September 2008, NOAA Technical Memorandum NOS-OR&R-30, 2009

OLIVEIRA, M., A. RIBEIRO, K. HYLLAND a L. GUILHERMINO, 2013. Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Ecological Indicators* [online]. **34**, 641-647 [cit. 2020-06-24]. DOI: 10.1016/j.ecolind.2013.06.019. ISSN 1470160X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470160X13002501>

PARK, Youngjin, Isabel S. ABIHSSIRA-GARCÍA, Sebastian THALMANN, Geert F. WIEGERTJES, Daniel R. BARREDA, Pål A. OLSVIK a Viswanath KIRON, 2020. Imaging Flow Cytometry Protocols for Examining Phagocytosis of Microplastics and Bioparticles by Immune Cells of Aquatic Animals. *Frontiers in Immunology* [online]. **11** [cit. 2020-06-24]. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00203. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.00203/full>

PENG, Guyu, Pei XU, Bangshang ZHU, Mengyu BAI a Daoji LI, 2018. Microplastics in freshwater river sediments in Shanghai, China: A case study of risk assessment in mega-cities. *Environmental Pollution* [online]. **234**, 448-456 [cit. 2020-07-01]. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.11.034. ISSN 02697491. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749117332797>

PITTURA, Lucia, Carlo G. AVIO, Maria E. GIULIANI, Giuseppe D'ERRICO, Steffen H. KEITER, Bettie CORMIER, Stefania GORBI a Francesco REGOLI, 2018. Microplastics as Vehicles of Environmental PAHs to Marine Organisms: Combined Chemical and Physical Hazards to the Mediterranean Mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Frontiers in Marine Science* [online]. **5** [cit. 2020-07-13]. DOI: 10.3389/fmars.2018.00103. ISSN 2296-7745. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmars.2018.00103/full>

POMA, Anna, Giulia VECCHIOTTI, Sabrina COLAFARINA, Osvaldo ZARIVI, Massimo ALOISI, Lorenzo ARRIZZA, Giuseppe CHICHIRICÒ a Piero DI CARLO, 2019. In Vitro Genotoxicity of Polystyrene Nanoparticles on the Human Fibroblast Hs27 Cell Line. *Nanomaterials* [online]. **9**(9) [cit. 2020-07-13]. DOI: 10.3390/nano9091299. ISSN 2079-4991. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2079-4991/9/9/1299>

PRENDERGAST-MILLER, Miranda, Andreas KATSIAMIDES, Mustafa ABBASS, Stephen STURZENBAUM, Karen THORPE a Mark HODSON, 2019. Polyester-derived microfibre impacts on the soil-dwelling earthworm *Lumbricus terrestris*. *Environmental Pollution* [online]. **251**, 453-459 [cit. 2020-07-30]. DOI: 10.1016/j.envpol.2019.05.037. ISSN 02697491. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749119309194>

QU, Man, Kangni XU, Yunhui LI, Garry WONG a Dayong WANG, 2018. Using acs-22 mutant *Caenorhabditis elegans* to detect the toxicity of nanopolystyrene particles. *Science of The Total Environment* [online]. **643**, 119-126 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.173. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969718322496>

RHEE, Jae-Sung, Sheikh RAISUDDIN, Kyun-Woo LEE, Jung SEO, Jang-Seu KI, Il-Chan KIM, Heum PARK a Jae-Seong LEE, 2009. Heat shock protein (Hsp) gene responses of the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* to environmental toxicants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* [online]. **149**(1), 104-112 [cit. 2020-07-30]. DOI: 10.1016/j.cbpc.2008.07.009. ISSN 15320456. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1532045608001415>

RIBEIRO, Francisca, Ana GARCIA, Beatriz PEREIRA, Maria FONSECA, Nélia MESTRE, Tainá FONSECA, Laura ILHARCO a Maria BEBIANNO, 2017. Microplastics effects in *Scrobicularia plana*. *Marine Pollution Bulletin* [online]. **122**(1-2), 379-391 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2017.06.078. ISSN 0025326X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025326X17305751>

RILLIG, Matthias C., Lisa ZIERSCH a Stefan HEMPEL, 2017. Microplastic transport in soil by earthworms. *Scientific Reports* [online]. **7**(1) [cit. 2020-07-04]. DOI: 10.1038/s41598-017-01594-7. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-01594-7>

RODRÍGUEZ-SEIJO, Andrés, João P. DA COSTA, Teresa ROCHA-SANTOS, Armando C. DUARTE a Ruth PEREIRA, 2018. Oxidative stress, energy metabolism and molecular responses of earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to low-density polyethylene microplastics. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. **25**(33), 33599-33610 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1007/s11356-018-3317-z. ISSN 0944-1344. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-018-3317-z>

ROSSI, Giulia, Jonathan BARNOUD a Luca MONTICELLI, 2014. Polystyrene Nanoparticles Perturb Lipid Membranes. *The Journal of Physical Chemistry Letters* [online]. **5**(1), 241-246 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1021/jz402234c. ISSN 1948-7185. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jz402234c>

RUBIO, Laura, Irene BARGUILLA, Josefa DOMENECH, Ricard MARCOS a Alba HERNÁNDEZ, 2020. Biological effects, including oxidative stress and genotoxic damage, of polystyrene nanoparticles in different human hematopoietic cell lines. *Journal of Hazardous Materials* [online]. **398** [cit. 2020-07-13]. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.122900. ISSN 03043894. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030438942030889X>

SALVATI, Anna, Christoffer ÅBERG, Tiago DOS SANTOS, Juan VARELA, Paulo PINTO, Iseult LYNCH a Kenneth A. DAWSON, 2011. Experimental and theoretical comparison of intracellular import of polymeric nanoparticles and small molecules: toward models of uptake kinetics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* [online]. **7**(6), 818-826 [cit. 2020-06-24]. DOI: 10.1016/j.nano.2011.03.005. ISSN 15499634. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S154996341100102X>

SARASAMMA, Sreeja, Gilbert AUDIRA, Petrus SIREGAR et al., 2020. Nanoplastics Cause Neurobehavioral Impairments, Reproductive and Oxidative Damages, and Biomarker Responses in Zebrafish: Throwing up Alarms of Wide Spread Health Risk of Exposure. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **21**(4) [cit. 2020-07-14]. DOI: 10.3390/ijms21041410. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/4/1410>

SENDRA, M., A. SACO, M.P. YESTE, A. ROMERO, B. NOVOA a A. FIGUERAS, 2020. Nanoplastics: From tissue accumulation to cell translocation into *Mytilus galloprovincialis* hemocytes. resilience of immune cells exposed to nanoplastics and nanoplastics plus *Vibrio splendidus* combination. *Journal of Hazardous Materials* [online]. **388** [cit. 2020-06-26]. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2019.121788. ISSN 03043894. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030438941931742X>

SENDRA, Marta, Eleonora STAFFIERI, María Pilar YESTE, Ignacio MORENO-GARRIDO, José Manuel GATICA, Ilaria CORSI a Julián BLASCO, 2019. Are the primary characteristics of polystyrene nanoplastics responsible for toxicity and ad/absorption in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*?. *Environmental Pollution* [online]. **249**, 610-619 [cit. 2020-07-07]. DOI: 10.1016/j.envpol.2019.03.047. ISSN 02697491. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749119302106>

SONAWANE, N., Jay THIAGARAJAH a A. VERKMAN, 2002. Chloride Concentration in Endosomes Measured Using a Ratioable Fluorescent Cl – Indicator. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **277**(7), 5506-5513 [cit. 2020-08-07]. DOI: 10.1074/jbc.M110818200. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M110818200>

SONG, Linsheng, Longtao WU, Duoqiao NI, Yaqing CHANG, Wei XU a Kezhi XING, 2006. The cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819) responding to bacteria challenge and naphthalin stress. *Fish & Shellfish Immunology*

[online]. **21**(4), 335-345 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1016/j.fsi.2005.12.011. ISSN 10504648. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050464806000039>

SUN, Shuge, Wei SHI, Yu TANG et al., 2020. Immunotoxicity of petroleum hydrocarbons and microplastics alone or in combination to a bivalve species: Synergic impacts and potential toxication mechanisms. *Science of the Total Environment* [online]. **728** [cit. 2020-08-05]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.138852. ISSN 00489697.

TANG, Jia, Xingzhen NI, Zhi ZHOU, Lingui WANG a Senjie LIN, 2018. Acute microplastic exposure raises stress response and suppresses detoxification and immune capacities in the scleractinian coral *Pocillopora damicornis*. *Environmental Pollution* [online]. **243**, 66-74 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.envpol.2018.08.045. ISSN 02697491. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749118321146>

TANG, Ting, Chen WU, Jigang LI, Guodong REN, Dawei HUANG a Fengsong LIU, 2012. Stress-induced HSP70 from *Musca domestica* plays a functionally significant role in the immune system. *Journal of Insect Physiology* [online]. **58**(9), 1226-1234 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2012.06.007. ISSN 00221910. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022191012001540>

TANG, Yu, Jiahuan RONG, Xiaofan GUAN et al., 2020b. Immunotoxicity of microplastics and two persistent organic pollutants alone or in combination to a bivalve species. *Environmental Pollution* [online]. **258** [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.envpol.2019.113845. ISSN 02697491. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749119339764>

TANG, Yu, Weishang ZHOU, Shuge SUN, Xueying DU, Yu HAN, Wei SHI a Guangxu LIU, 2020a. Immunotoxicity and neurotoxicity of bisphenol A and microplastics alone or in combination to a bivalve species, *Tegillarca granosa*. *Environmental Pollution* [online]. **265** [cit. 2020-07-14]. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.115115. ISSN 02697491. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749120315049>

THUBAGERE, Anupama a Björn REINHARD, 2010. Nanoparticle-Induced Apoptosis Propagates through Hydrogen-Peroxide-Mediated Bystander Killing: Insights from a Human Intestinal Epithelium In Vitro Model. *ACS Nano* [online]. **4**(7), 3611-3622 [cit. 2020-07-08]. DOI: 10.1021/nn100389a. ISSN 1936-0851. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/nn100389a>

TLILI, Sofiene, Dorsaf JEMAI, Samar BRINIS a Imed REGAYA, 2020. Microplastics mixture exposure at environmentally relevant conditions induce oxidative stress and neurotoxicity in the wedge clam *Donax trunculus*. *Chemosphere* [online]. **258** [cit. 2020-07-14]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.127344. ISSN 00456535. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004565352031537X>

TORN, K., 2020. Microplastics uptake and accumulation in the digestive system of the mud crab *Rhithropanopeus harrisi*. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences* [online]. **69**(1) [cit. 2020-07-02]. DOI: 10.3176/proc.2020.1.04. ISSN 1736-6046. Dostupné z: http://www.kirj.ee/?id=33025&tpl=1061&c_tpl=1064

VARÓ, Inmaculada, Aurora PERINI, Amparo TORREBLANCA, Yaiza GARCIA, Elisa BERGAMI, Maria VANNUCCINI a Ilaria CORSI, 2019. Time-dependent effects of polystyrene nanoparticles in brine shrimp *Artemia franciscana* at physiological, biochemical and molecular levels. *Science of The Total Environment* [online]. **675**, 570-580 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.04.157. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969719316869>

VAUGHAN, Rebecca, Simon D. TURNER a Neil L. ROSE, 2017. Microplastics in the sediments of a UK urban lake. *Environmental Pollution* [online]. **229**, 10-18 [cit. 2020-07-01]. DOI:

10.1016/j.envpol.2017.05.057. ISSN 02697491. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749117309557>

VIRŠEK, Manca Kovač, Marija Nika LOVŠIN, Špela KOREN, Andrej KRŽAN a Monika PETERLIN, 2017. Microplastics as a vector for the transport of the bacterial fish pathogen species *Aeromonas salmonicida*. *Marine Pollution Bulletin* [online]. **125**(1-2), 301-309 [cit. 2020-07-04]. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2017.08.024. ISSN 0025326X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025326X1730694X>

VON MOOS, Nadia, Patricia BURKHARDT-HOLM a Angela KÖHLER, 2012. Uptake and Effects of Microplastics on Cells and Tissue of the Blue Mussel *Mytilus edulis* L. after an Experimental Exposure. *Environmental Science & Technology* [online]. **46**(20), 11327-11335 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1021/es302332w. ISSN 0013-936X. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es302332w>

WANG, Fengjuan, Mariana BEXIGA, Sergio ANGUSSOLA, Patricia BOYA, Jeremy SIMPSON, Anna SALVATI a Kenneth DAWSON, 2013a. Time resolved study of cell death mechanisms induced by amine-modified polystyrene nanoparticles. *Nanoscale* [online]. **5**(22) [cit. 2020-07-07]. DOI: 10.1039/c3nr03249c. ISSN 2040-3364. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3nr03249c>

WANG, Fengjuan, Mariana BEXIGA, Sergio ANGUSSOLA, Patricia BOYA, Jeremy SIMPSON, Anna SALVATI a Kenneth DAWSON, 2013b. Time resolved study of cell death mechanisms induced by amine-modified polystyrene nanoparticles. *Nanoscale* [online]. **5**(22) [cit. 2020-07-08]. DOI: 10.1039/c3nr03249c. ISSN 2040-3364. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3nr03249c>

WANG, Jundong, Jinping PENG, Zhi TAN, Yifan GAO, Zhiwei ZHAN, Qiuqiang CHEN a Liqi CAI, 2017. Microplastics in the surface sediments from the Beijiang River littoral zone: Composition, abundance, surface textures and interaction with heavy metals. *Chemosphere* [online]. **171**, 248-258 [cit. 2020-07-01]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.12.074. ISSN 00456535. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653516318069>

WANG, Qiangqiang, Jialei BAI, Baoan NING et al., 2020. Effects of bisphenol A and nanoscale and microscale polystyrene plastic exposure on particle uptake and toxicity in human Caco-2 cells. *Chemosphere* [online]. **254** [cit. 2020-07-08]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.126788. ISSN 00456535. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653520309814>

WANG, Shuyu, Minhao LIU, Jinman WANG, Jingshan HUANG a Jun WANG, 2020. Polystyrene nanoplastics cause growth inhibition, morphological damage and physiological disturbance in the marine microalga *Platymonas helgolandica*. *Marine Pollution Bulletin* [online]. **158** [cit. 2020-07-07]. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2020.111403. ISSN 0025326X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025326X2030521X>

WANG, Wenfeng, Wenke YUAN, Yuling CHEN a Jun WANG, 2018. Microplastics in surface waters of Dongting Lake and Hong Lake, China. *Science of The Total Environment* [online]. **633**, 539-545 [cit. 2020-07-01]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.03.211. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969718309707>

WANG, Zhongliang, Zaohe WU, Jichang JIAN a Yishan LU, 2009. Cloning and expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of pearl oyster (*Pinctada fucata*, Gould 1850) responding to bacterial challenge. *Fish & Shellfish Immunology* [online]. **26**(4), 639-645 [cit. 2020-07-31]. DOI: 10.1016/j.fsi.2008.10.011. ISSN 10504648. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050464808002398>

WAN, Zhiqin, Caiyun WANG, Jiajie ZHOU, Manlu SHEN, Xiaoyu WANG, Zhengwei FU a Yuanxiang JIN, 2019. Effects of polystyrene microplastics on the composition of the microbiome and metabolism in larval zebrafish. *Chemosphere* [online]. **217**, 646-658 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.11.070. ISSN 00456535. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653518321775>

WU, Bing, Xiaomei WU, Su LIU, Zhizhi WANG a Ling CHEN, 2019. Size-dependent effects of polystyrene microplastics on cytotoxicity and efflux pump inhibition in human Caco-2 cells. *Chemosphere* [online]. **221**, 333-341 [cit. 2020-07-06]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.01.056. ISSN 00456535. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653519300566>

WU, Donglei, Zhiquan LIU, Mingqi CAI, Yang JIAO, Yiming LI, Qiang CHEN a Yunlong ZHAO, 2019. Molecular characterisation of cytochrome P450 enzymes in waterflea (*Daphnia pulex*) and their expression regulation by polystyrene nanoplastics. *Aquatic Toxicology* [online]. **217** [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.aquatox.2019.105350. ISSN 0166445X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X19306617>

XIA, Tian, Michael KOVOCHICH, Monty LIONG, Jeffrey ZINK a Andre NEL, 2008. Cationic Polystyrene Nanosphere Toxicity Depends on Cell-Specific Endocytic and Mitochondrial Injury Pathways. *ACS Nano* [online]. **2**(1), 85-96 [cit. 2020-08-06]. DOI: 10.1021/nn700256c. ISSN 1936-0851. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/nn700256c>

XU, Mingkai, Gulinare HALIMU, Qianru ZHANG, Yubo SONG, Xuanhe FU, Yongqiang LI, Yansheng LI a Huiwen ZHANG, 2019. Internalization and toxicity: A preliminary study of effects of nanoplastic particles on human lung epithelial cell. *Science of the Total Environment* [online]. **694** [cit. 2020-08-05]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.133794. ISSN 00489697.

YANG, Huilin, Hong LAI, Jing HUANG et al., 2020. Polystyrene microplastics decrease F-53B bioaccumulation but induce inflammatory stress in larval zebrafish. *Chemosphere* [online]. **255** [cit. 2020-07-21]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.127040. ISSN 00456535. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653520312339>

YU, Ping, Zhiquan LIU, Donglei WU, Minghai CHEN, Weiwei LV a Yunlong ZHAO, 2018. Accumulation of polystyrene microplastics in juvenile *Eriocheir sinensis* and oxidative stress effects in the liver. *Aquatic Toxicology* [online]. **200**, 28-36 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.aquatox.2018.04.015. ISSN 0166445X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X18300420>

ZHAN, Zhiwei, Jundong WANG, Jinping PENG, Qilai XIE, Ying HUANG a Yifan GAO, 2016. Sorption of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl by microplastics: A case study of polypropylene. *Marine Pollution Bulletin* [online]. **110**(1), 559-563 [cit. 2020-07-04]. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2016.05.036. ISSN 0025326X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025326X16303381>

ZHENG, Tongtong, Dong YUAN a Chunguang LIU, 2019. Molecular toxicity of nanoplastics involving in oxidative stress and desoxyribonucleic acid damage. *Journal of Molecular Recognition* [online]. **32**(11) [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1002/jmr.2804. ISSN 0952-3499. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jmr.2804>